



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Infecção por *Cryptosporidium parvum*:
resposta imunológica e tecnologia de
anticorpos monoclonais para o diagnóstico**

Vera Alexandra da Rosa Codices

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA**

ABRIL, 2013



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Infecção por *Cryptosporidium parvum*: resposta imunológica e tecnologia de anticorpos monoclonais para o diagnóstico

Vera Alexandra da Rosa Codices

Licenciada em Ciências Farmacêuticas

Mestre em Doenças Infecciosas Emergentes

Orientador: Professora Doutora Olga Matos (IHMT/UNL)
Co-orientador: Investigador Doutor Carlos Novo (IHMT/UNL)
Comissão tutorial: Professor Doutor Francisco Antunes (HSM/FM/UL)
Investigador Doutor Carlos Novo (IHMT/UNL)
Professora Doutora Olga Matos (IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor no Ramo de Ciências Biomédicas, Especialidade de Parasitologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Olga Matos e co-orientação científica do Investigador Doutor Carlos Novo. Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), com a bolsa de doutoramento SFRH/BD/46558/2008.

ABRIL, 2013



*Success is not a place at which one arrives but rather the spirit
with which one undertakes and continues the journey.*

Alex Noble



Aos meus Avós.

Dissertação escrita de acordo com a antiga ortografia.

Agradecimentos

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por ter providenciado as condições necessárias ao desenvolvimento do meu trabalho.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro dado pela Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/46558/2008).

À Professora Doutora Olga Matos, que orientou o presente trabalho, agradeço o empenho e esforço neste projecto, os “instrumentos” que me deu para trabalhar, a constante disponibilidade, os conhecimentos transmitidos, as oportunidades que me proporcionou, e a amizade, que me permitiram crescer como investigadora.

Ao Investigador Doutor Carlos Novo, como co-orientador deste trabalho, agradeço a confiança em mim depositada e apoio científico prestados. O meu reconhecimento pela disponibilidade e entusiasmo na co-orientação deste trabalho e, muito em especial, pelo modo prático com que me ensinou a encarar as adversidades típicas do trabalho científico.

Ao Professor Doutor Francisco Antunes, expresso os meus sinceros agradecimentos por ter aceitado ser membro da comissão tutorial e por ter acompanhado este trabalho.

À Dr.^a Catarina Martins, agradeço o valioso apoio, inegável disponibilidade e conhecimento transmitido, indispensáveis na execução do presente trabalho.

Ao Professor Doutor Mário Pinho, o meu muito obrigado pela preciosa disponibilidade na preparação, tratamento e análise das amostras histológicas dos modelos animais utilizados neste projecto.

Ao Professor Doutor Bruno de Sousa, agradeço a prontidão e incansável ajuda dada ao nível da análise estatística dos dados e dos resultados, obtidos nas diferentes fases deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luis Miguel Borrego, o meu muito obrigado por me ter recebido no seu laboratório e pela disponibilidade apresentada durante a execução do trabalho.

Ao Dr. Moussa Elbayoumy, os meus sinceros agradecimentos pela revisão e edição linguística dos artigos escritos e publicados no âmbito deste trabalho.

À Ângela Lopes, à Glória Nunes e à Amélia Bastos, pela preciosa assistência laboratorial, que em muito facilitou a rápida progressão do presente trabalho.

A todos os meus colegas que passaram pela Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, actualmente, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários (GPOOP) da Unidade de Parasitologia Médica, especialmente ao Doutor Francisco Esteves e à Doutora Luísa Lobo, agradeço pela prontidão e amizade com que me receberam, pelo companheirismo e pela generosa ajuda durante todo este período. Ao Investigador Auxiliar Fernando Cardoso, o meu reconhecimento pela colaboração, convivência e amizade.

À Professora Doutora Deolinda Auxtero, a quem estou eternamente grata pelo convite para ser sua Assistente nas aulas práticas da Unidade Curricular de Farmácia Galénica do ISCSEM, e especialmente, a Amizade.

À Professora Doutora Ana Isabel Fernandes, o meu muito obrigada pela oportunidade dada para leccionar a vertente prática das Unidades Curriculares de Tecnologia Farmacêutica II e III.

Aos meus amigos de sempre, constantemente presentes, que se viram pontualmente privados da minha presença, para que me pudesse dedicar à concretização deste projecto, estendo o meu mais profundo apreço a todos eles.

Aos meus Pais, os meus Heróis, obrigada por serem o exemplo perfeito do que é nunca desistir de correr atrás do sonho, e pelo apoio e amor constantes. À minha Irmã, por me ter sempre apoiado incondicionalmente. Aos meus Avós, que me viram iniciar este projecto mas que já não puderam estar fisicamente presentes para o ver terminado, estarão sempre comigo. Aos meus sogros pela dedicação e afeição constantes. A toda a minha família, agradeço a sua amizade.

Ao João, a minha cara-metade, expresso a minha profunda gratidão pela partilha e constante motivação, apoio incondicional, carinho e Amor, o meu Muito Obrigada!

Resumo

Infecção por *Cryptosporidium parvum*: resposta imunológica e tecnologia de anticorpos monoclonais para o diagnóstico

Vera Alexandra da Rosa Codices

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium parvum*, citometria de fluxo, linfócitos B, linfócitos T, Luminex® xMAP, citocinas, imunoglobulinas, hibridomas, imunofluorescência, detecção.

Cryptosporidium parvum é um protozoário intracelular, de distribuição ubiquitária, que causa enterite em humanos e animais. A diarreia é autolimitada em indivíduos imunocompetentes, podendo ser fatal em imunocomprometidos. Actualmente não existem terapêuticas específicas ou preventivas disponíveis, e o elevado custo dos actuais métodos de diagnóstico, sustentam a importância do desenvolvimento de novas abordagens.

Vários estudos salientam a importância das células T CD4⁺ na resposta imunitária à infecção por *C. parvum*; outros direccionam a sua atenção para as células reguladoras (Treg); e outros tentam esclarecer qual o papel das citocinas específicas produzidas pelas células Th₁ e Th₂, na regulação da resposta imune, acompanhada pela produção de imunoglobulinas particulares. Na área do diagnóstico, vários e diferentes métodos têm sido utilizados, variando entre a rapidez de execução, especificidade e custo. Várias questões colocam-se, relacionadas com as características das células envolvidas na resposta à infecção e com a especificidade/sensibilidade de cada técnica.

Com o objectivo de estudar a resposta imunitária de longo-termo à infecção por *C. parvum*, no modelo animal imunocompetente, murganhos Balb/c foram inoculados por via oral com oocistos de *C. parvum*, e efectuadas colheitas e análise de amostras fecais, intestino, sangue e baço, segundo um protocolo previamente definido. A caracterização das populações celulares do sangue e baço foi feita por citometria de fluxo e a identificação e quantificação de imunoglobulinas e citocinas no soro, por tecnologia xMAP® Luminex. A análise por citometria de fluxo não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os murganhos infectados e os controlos, tendo sido apenas observado um aumento do número de neutrófilos e eosinófilos circulantes, e a sua posterior diminuição, no primeiro grupo de murganhos. Associada à elevada variabilidade observada após a reinfecção, tais variações são sugeridas como sendo o perfil exibido por estas populações de células no contexto de infecção por *C. parvum* no organismo imunocompetente, particularmente os eosinófilos, que apresentam um comportamento idêntico em infecção por outros parasitas.

O aumento da secreção de TNF- α e IFN- γ (citocinas Th₁) nos murganhos infectados, comparativamente com os grupos controlo, para além da secreção de

citocinas Th₂, como IL-4, IL-5 e IL-10, após a reinfecção, sugere um balanço entre as respostas Th₁, para controlar o crescimento do parasita, e Th₂, para limitar a patologia. A IgG1 foi o isotipo predominante ao longo de toda a infecção e reinfecção, tendo-se observado um pico de IgG2a após a reinfecção, seguido de diminuição. Esta variação poderá estar relacionada com a função da IgG1 e da IgG2a, ao nível da opsonização e neutralização dos agentes patogénicos, respectivamente.

A obtenção de hibridomas secretores de anticorpos específicos para antígenos de *C. parvum*, por fusão celular, permitiu obter anticorpos e testar a sua aplicação à detecção de oocistos de *C. parvum*, em amostras fecais humanas e de animais (bovinos).

Em resumo, os resultados obtidos permitem sugerir o perfil de imunoglobulinas e citocinas envolvido na resposta à infecção por *C. parvum* no modelo roedor imunocompetente, assim como desenvolver um futuro “kit” para detecção de *C. parvum* em amostras biológicas, por técnicas de imunofluorescência.

Abstract

***Cryptosporidium parvum* infection: immunological response and monoclonal antibodies technology for diagnosis**

Vera Alexandra da Rosa Codices

KEYWORDS: *Cryptosporidium parvum*, flow cytometry, B-lymphocytes, T-lymphocytes, Luminex® xMAP, cytokine, immunoglobulin, hybridomas, immunofluorescence, detection.

Cryptosporidium parvum is an intracellular protozoan, with a ubiquitous distribution, causing enteritis in humans and animals. Diarrhea is self-limited in immunocompetent individuals, becoming life-threatening in immunocompromised hosts. Currently, specific therapeutic or preventive interventions are not yet available, and the high cost of existing diagnosis methods, support the importance of developing new approaches.

Several studies highlight the importance of CD4⁺ T cells in the immune response to infection by *C. parvum*; others address their attention to the immunoregulatory cells (Treg); and even others attempt to clarify the role of specific cytokines produced by Th₁ and Th₂ cells to regulate the immune response, together with the production of specific immunoglobulins. In the diagnostic field, several and different methods have been used, varying between speed of execution, specificity and price. Several questions arise related to the type of cells involved in the response to infection and the specificity/sensitivity of each technique.

With the aim of studying the long-term immune response to infection by *C. parvum*, in immunocompetent animal, Balb/c mice were orally inoculated with *C. parvum* oocysts, and faeces, small intestines, blood and spleens were collected for analysis, according to a previously defined protocol. Peripheral blood and spleen cell populations were characterized by flow cytometry, and Luminex xMAP® technology assay was used to quantify immunoglobulins and cytokines in serum. The flow cytometry analysis did not show statistically significant differences between the control and infected mice, having only been observed an increase in the number of circulating neutrophils and eosinophils, and their subsequent decrease, in the latter group. Associated with the high variability observed after reinfection, such variations are suggested as the profile exhibited by these cell populations in the context of an infection by *C. parvum* in immunocompetent organism, especially eosinophils, which have a similar behavior upon infection by other parasites.

The increased secretion of TNF- α and IFN- γ (Th₁ cytokines) in infected mice, when compared with the control group, beyond the secretion of Th₂ cytokines (IL-4, IL-5 and IL-10), after reinfection, suggests a balance between Th₁ cells to control parasite growth, and Th₂ to limit the pathology.

IgG1 was the predominant isotype along infection and reinfection, with a peak of IgG2a after reinfection, followed by its decrease. This variation may be related to the function of IgG1 and IgG2a, namely in pathogens opsonization and their neutralization, respectively.

The obtaining of hybridomas secreting antibodies specific for *C. parvum* antigens by cell fusion, allowed us to obtain antibodies and test them in the detection of oocysts of *C. parvum* in faecal samples from human and cattle.

In brief, the obtained results suggest the profile of immunoglobulins and cytokines involved in the response to infection by *C. parvum* in immunocompetent mice, as well as developing a future "kit" for detecting *C. parvum* in biological samples by immunofluorescence.

Lista de abreviaturas

Parte I

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
$\alpha\beta$ -TCR	Receptores alfa-beta das células T, do inglês “alpha-beta-T-cell receptor”
APCs	Células apresentadoras de antígenos, do inglês “antigen-presenting cells”
β -defensinas	Beta-defensinas
β -tubulina	Beta-tubulina
BCR	Receptor da célula B, do inglês “B-cell receptor”
CCL	do inglês “chemokine (C-C motif) ligand”
CD	“cluster” de diferenciação, do inglês “cluster of differentiation”
CDC	do inglês “Centers for disease control and prevention”
COWP	Proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> , do inglês “ <i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein”
DCs	Células dendríticas, do inglês “dendritic cells”
DHFR	Dihidrofolato reductase, do inglês “dihydrofolate reductase”
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
ELISA	do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
<i>et al.</i>	E outros, da locução latina <i>et alii</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês “Food and Drug Administration”
FL	Fluorescência
FSC	Dispersão da luz para a frente, do inglês “forward angle light scatter”

gp	Glicoproteína
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa, do inglês “heat shock protein”
ICZN	do inglês “International Commission on Zoological Nomenclature”
IECs	Células do epitélio intestinal, do inglês “intestinal epithelial cells”
IFN- γ	Interferão-gama, do inglês “interferon-gamma”
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Sintetase do óxido nítrico, do inglês “inducible nitric oxide synthase”
ITS	Espaçadores internos transcritos, do inglês “internal transcribed spacers”
kDa	Kilo dalton
MHC	Complexo major de histocompatibilidade, do inglês “major histocompatibility complex”
mm ³	Milímetro cúbico
NK	Linfócitos “natural killer”
NLRs	Receptores intracelulares “Nod-like”, do inglês “intracellular Nod-like receptors”
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico, do inglês “nitric oxide”
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês “pathogen-associated molecular patterns”
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico, do inglês “peripheral blood mononuclear cell”
PCR	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês “polymerase chain reaction”
pH	Símbolo do logaritmo decimal do potencial de hidrogénio de uma solução aquosa

RAPD	Amplificação de polimorfismos de distribuição aleatória, do inglês “random amplified polymorphic DNA”
RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição, do inglês “restriction fragment length polymorphism”
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
sp.	Espécie
spp.	Espécies
SSC	Dispersão lateral da luz laser, do inglês “side angle light scatter”
SSU rRNA	Subunidade pequena do ácido ribonucleico ribossômico, do inglês “small subunit ribosomal ribonucleic acid”
TARV	Terapêutica antirretrovírica
Th	Linfócito T auxiliar, do inglês “T helper”
TLR	Receptores “toll-like”, do inglês “toll-like receptor”
TNF- α	Factor de necrose tumoral-alfa, do inglês “tumor necrosis factor alpha”
TRAP-C	Proteína de adesão relacionada com a trombospondina de <i>Cryptosporidium</i> , do inglês “thrombospondin-related adhesive protein of <i>Cryptosporidium</i> ”
Treg	Linfócitos T reguladores
UV	Luz ultravioleta
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
μm	Micrómetro

Parte II

°C	Graus celsius
%	Porcentagem
% w/v	do inglês “mass/volume percentage” or “mass concentration”
% v/v	do inglês “volume/volume percentage” or “volume concentration”
5PL	do inglês “five-parameter logistic regression”
AIDS	do inglês “acquired immunodeficiency syndrome”
APC	do inglês “allophycocyanin”
β-giardin	do inglês “beta-giardin”
BALB/C	do inglês “bagg albino”
BD	do inglês “Becton Dickinson”
bp	do inglês “basepairs”
BSA	do inglês “bovine serum albumin”
CD	do inglês “cluster of differentiation”
cells/ml	do inglês “cells per milliliter”
CM	do inglês “control mice”
DIF	do inglês “direct immunofluorescence”
DMEM	do inglês “dulbecco’s modified eagle’s medium”
DN	do inglês “double negative”
DNA	do inglês “deoxyribonucleic acid”
DP	do inglês “double positive”
EDTA	do inglês “ethylenediaminetetraacetic acid”
ELISA	do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
<i>et al.</i>	E outros, da locução latina <i>et alii</i>
FC	do inglês “flow cytometry”

FCS	do inglês “fetal calf serum”
FITC	do inglês “fluorescein isothiocyanate”
FMO	do inglês “fluorescence minus one”
Foxp3	do inglês “Fork head box p3”
FSC	do inglês “forward angle light scatter”
<i>g</i>	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
gDNA	do inglês “deoxyribonucleic genomic acid”
GM-CSF	do inglês “granulocyte–macrophage colony-stimulating factor”
GP	do inglês “glycoprotein”
h	do inglês “hour”
HAT	do inglês “hypoxanthine-aminopterin-thymidine”
IF	do inglês “immunofluorescence assay”
IFI	do inglês “indirect immunofluorescence assay”
IFN- γ	do inglês “interferon-gamma”
Ig	do inglês “immunoglobulin”
IL	do inglês “interleukin”
IM	do inglês “infected mice”
kDa	Kilo dalton
M	Concentração molar
mAb	do inglês “monoclonal antibody”
mg/ml	miligrama por mililitro
MHC	do inglês “major histocompatibility complex”
min	Minutos
MLNs	do inglês “mesenteric lymph nodes”
mM	Milimolar

N	do inglês “negative”
ng/ml	Nanograma por mililitro
NK	do inglês “natural killer”
nm	Nanómetro
NO	do inglês “nitric oxide”
P	do inglês “positive”
PBS	do inglês “phosphate buffered saline”
PBS-T	do inglês “phosphate buffered saline-tween”
PCR	do inglês “polymerase chain reaction”
PE	do inglês “phycoerythrin”
PEG	do inglês “polyethylene glycol”
PerCP	do inglês “peridinin chlorophyll protein”
pg/ml	Picograma por mililitro
pH	Símbolo do logaritmo decimal do potencial de hidrogénio de uma solução aquosa
PI	do inglês “post-infection”
PMT	do inglês “photomultiplier”
PRI	do inglês “post-reinfection”
rpm	do inglês “revolutions per minute”
SCID	do inglês “severe combined immunodeficiency”
sp.	do inglês “specie”
SPF	do inglês “specific-pathogen-free”
spp.	do inglês “species”
SSC	do inglês “side angle light scatter”
TCR- $\alpha\beta$	do inglês “alpha-beta-T-cell receptor”

TCR β	do inglês “beta-T-cell receptor”
TCR $\gamma\delta$	do inglês “gamma-delta-T-cell receptor”
Th	do inglês “T helper”
TNF- α	do inglês “tumor necrosis factor alpha”
Treg	do inglês “regulatory T cells”
vs	do latim <i>versus</i>
ZN	Ziehl-Neelsen
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro

Índice geral

Agradecimentos.....	ix
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
Lista de abreviaturas	xvii
Índice geral	xxv
Lista de figuras.....	xix
Lista de quadros.....	xxx
Parte I – Revisão bibliográfica	1
Capítulo 1.....	3
1.1. Criptosporidiose: aspectos gerais.....	3
1.2. Taxonomia.....	5
1.3. Ciclo de vida.....	10
1.4. Epidemiologia da criptosporidiose.....	14
1.4.1. Criptosporidiose no Homem.....	15
1.4.2. Criptosporidiose nos animais.....	20
1.4.3. Reservatórios e transmissão da criptosporidiose	24
1.4.3.1. Transmissão antroponótica	26
1.4.3.2. Transmissão zoonótica.....	28
1.4.3.3. Transmissão alimentar	29
1.4.3.4. Transmissão hídrica	31
1.4.3.5. Transmissão mecânica por vectores.....	33
1.4.4. Epidemiologia molecular da criptosporidiose	33
1.5. Aspectos clínicos da criptosporidiose humana	38
1.6. Diagnóstico da criptosporidiose	43
1.6.1. Diagnóstico histológico	43
1.6.2. Diagnóstico coprológico.....	44
1.6.3. Diagnóstico imunológico.....	45

1.6.4. Citometria de fluxo	46
1.6.5. Tecnologia xMAP®	50
1.6.6. Diagnóstico molecular	54
1.7. Tratamento da criptosporidiose humana	57
1.8. Prevenção e controlo da criptosporidiose.....	60
1.9. Resposta imune à infecção por <i>Cryptosporidium</i>.....	64
1.9.1. Resposta imune inata: infecção por <i>Cryptosporidium</i>	65
1.9.2. Resposta imune adaptativa: infecção por <i>Cryptosporidium</i>	67
1.9.3. Citocinas e controlo da infecção por <i>Cryptosporidium</i>	70
1.9.4. Anticorpos e controlo da infecção por <i>Cryptosporidium</i>	71
1.10. Referências	74
 Parte II – Infecção por <i>Cryptosporidium parvum</i>: resposta imunológica e tecnologia de anticorpos monoclonais para o diagnóstico	123
Capítulo 2	125
Objectivos	125
 Capítulo 3	127
Cell phenotypic change due to <i>Cryptosporidium parvum</i> infection in immunocompetent mice	127
Abstract.....	129
Introduction.....	129
Materials and Methods.....	130
Mice.....	130
Parasites and infection studies.....	130
Flow cytometric analysis of spleen and peripheral blood cell populations....	131
Statistical analysis	131
Results	131
Infectivity assay.....	131
Flow cytometry analysis.....	132
Analysis of peripheral blood – leukocyte subpopulations.....	132
Analysis of peripheral blood – lymphocyte subpopulations.....	133

Analysis of spleen cell populations.....	135
Discussion	135
References.....	137
 Capítulo 4.....	 139
Dynamics of cytokines and immunoglobulins serum profiles in primary and secondary <i>Cryptosporidium parvum</i> infection: Usefulness of Luminex® xMAP technology.....	139
Abstract	141
Introduction	142
Materials and Methods	142
Mice	142
Infection studies	142
Serological studies	143
Luminex xMAP technology assay: determination of immune mediators..	143
Mouse serum cytokines	143
Mouse serum immunoglobulins	143
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	143
Statistical analysis	143
Results.....	143
Infectivity assay	143
Serological studies	144
Mouse serum cytokines.....	144
Mouse serum immunoglobulins.....	144
Statistical analysis	145
Discussion	145
References.....	147
 Capítulo 5.....	 149
Monoclonal antibody technology applied to the detection of <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts in human and cattle fecal samples	149
Abstract	151
Introduction	151

Materials and Methods.....	152
Oocyst extract preparation.....	152
Immunization.....	152
Serum titer determination.....	152
Cell culture and hybridoma generation	153
Indirect immunofluorescence assay	153
Fecal samples analysis by immunofluorescence using the hybridomas supernatants	153
Results	154
Hybridomas screening	154
Indirect immunofluorescence assay	154
Fecal samples analysis by immunofluorescence using the hybridomas supernatants	154
Discussion.....	155
References	158
Parte III – Conclusões.....	161
Capítulo 6	163
Conclusões gerais e perspectivas futuras.....	163
Anexos	167
Anexo 1	169
Anexo 2	171

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1. Representação esquemática e abreviada da classificação taxonómica de <i>Cryptosporidium</i>	6
Figura 2. Processo de excitação em <i>Cryptosporidium</i>	11
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i>	12
Figura 4. Oocisto de <i>Cryptosporidium</i>	13
Figura 5. Transmissão de criptosporidiose humana.....	25
Figura 6. Citometria de fluxo	48
Figura 7. Populações de células sanguíneas.....	49
Figura 8. Microsfera de poliestireno	51
Figura 9. Microsfersas de poliestireno em suspensão	52
Figura 10. Plataforma Luminex	53

Capítulo 3

Figure 1. Histological examination of small intestine.....	132
Figure 2. Variability of TCR $\alpha\beta^+$ T cell subpopulations	134
Figure 3. Variability of CD25 expression in CD3 $^+$ CD4 $^+$ T cells	135

Capítulo 4

Figure 1. Cytokine levels during infection and reinfection, in infected and non-infected control mice.....	144
Figure 2. Immunoglobulin levels during infection and reinfection, in infected and non-infected control mice.....	145

Capítulo 5

Figure 1. <i>C. parvum</i> oocysts detected by immunofluorescence assay (1000x)	154
Figure 2. Direct and indirect immunofluorescence assay of human and cattle fecal samples with hybridomas supernatants and the commercial kit Crypt-a-Glo.....	156

Lista de quadros

Capítulo 1

Quadro I. Espécies de *Cryptosporidium*9

Quadro II. Determinantes epidemiológicos dos oocistos de *Cryptosporidium*26

Capítulo 3

Table I. Flow cytometry analysis for leukocyte subpopulations 132

Table II. Flow cytometry analysis for lymphocyte subpopulations 133

Table III. Flow cytometry analysis of lymphocytes in spleen cells 133

Capítulo 4

Table 1. Total immunoglobulin isotypes in serum samples of *C. parvum* infected mice, determined by ELISA, during infection and reinfection processes (35 days) . 145

Table 2. Total immunoglobulin G subclasses in serum samples of *C. parvum* infected mice, determined by ELISA, during infection and reinfection processes (35 days) . 145

Capítulo 5

Table 1. Indirect immunofluorescence assay (IFI) for hybridomas supernatants specificity against human and cattle fecal samples 155

Table 2. Reliability percentages values between direct and indirect immunofluorescence assays with the reference methods, ZN and PCR 156

Parte I

Revisão bibliográfica

Capítulo 1

1.1. CRIPTOSPORIDIOSE: ASPECTOS GERAIS

Os microrganismos do género *Cryptosporidium*, foram descritos pelo parasitologista americano Ernest Tyzzer, pela primeira vez, em 1907, após observação de diversas formas assexuadas e sexuadas na mucosa gástrica de murganhos (*Mus musculus*), os quais resultavam na formação de oocistos contendo quatro esporozoítos (Tyzzer, 1907). Tyzzer identificou os parasitas como tendo estatuto taxonómico incerto e, em 1910, descreveu-os detalhadamente ao nível do ciclo de vida e das formas de desenvolvimento. O novo género foi nomeado de *Cryptosporidium* (que significa esporocisto oculto) e a espécie foi designada de *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1910). Em 1912, este parasitologista detectou microrganismos semelhantes no intestino delgado do murganho, mas considerou-os como sendo outra espécie, *Cryptosporidium parvum*, por apresentarem tamanho inferior ao dos oocistos de *C. muris* (Tyzzer, 1912).

Nos anos seguintes descreveram-se cerca de 20 novas espécies pertencentes ao género *Cryptosporidium*, classificadas com base no hospedeiro em que ocorreram (mamíferos, aves, peixes e répteis), o qual estaria, supostamente, parasitado por diferentes espécies deste parasita. Estudos posteriores de transmissão cruzada mostraram que a classificação fora erroneamente atribuída a este género e que algumas destas espécies seriam esporocistos de *Sarcocystis* (Anderson *et al.*, 1968; Xiao *et al.*, 2004a), invalidando, desse modo, a classificação efectuada (Levine, 1984; O'Donoghue, 1995; Fayer, 2010). Apesar de Slavin, em 1955, ter descrito uma nova espécie, *Cryptosporidium meleagridis*, no intestino de perus, em associação com um quadro clínico caracterizado por diarreia grave e mortalidade baixa, a importância deste parasita manteve-se reduzida (Slavin, 1955; O'Donoghue, 1995).

O interesse da Medicina Veterinária nestes microrganismos aumentou após ter sido demonstrada a associação de parasitas do género *Cryptosporidium* com diarreia em vitelos, em 1971 (Panciera *et al.*, 1971). Desde então, vários autores descreveram casos de diarreia aguda causados por este parasita, em animais silváticos e domésticos (Casemore *et al.*, 1985a; Current & Garcia, 1991).

Em 1976, foram reportados os dois primeiros casos de criptosporidiose humana, nos Estados Unidos da América (EUA). Nime *et al.* (1976) descreveram o caso de uma criança de três anos e, Meisel *et al.* (1976), relataram o caso de um doente de 39 anos, sujeito a terapêutica imunossupressora para tratamento de doença auto-imune. Ambos os doentes partilhavam os factos comuns de viverem em zonas rurais, de estarem em contacto com gado e de apresentarem diarreia severa. Em ambos os casos, o diagnóstico foi feito por exame microscópico de uma amostra de biópsia intestinal.

Em 1982, dois relatórios do “U.S. Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) reportaram a ocorrência de um surto de criptosporidiose humana no Alabama, num grupo de 12 imunocompetentes, todos tratadores de bezerros com diarreia (Centers for Disease Control and Prevention, 1982a), e um outro surto num grupo de 21 doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (Centers for Disease Control and Prevention, 1982b). A criptosporidiose tornou-se num assunto de saúde pública após o surto epidémico de infecção por *Cryptosporidium* transmitido através da rede de abastecimento público de água, em Milwaukee, nos EUA, em 1993, estimando-se que aproximadamente 403.000 pessoas tenham sido infectadas (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Desde então, o interesse por este protozoário passou a envolver não só a comunidade médica e científica, como também as autoridades de saúde pública.

O reconhecimento da importância deste parasita é visível através do aumento exponencial do número de publicações relacionadas com *Cryptosporidium*, desde 1982 até ao presente, citadas na “National Library of Medicine” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), nomeadamente no que se refere à infecção, biologia, epidemiologia, taxonomia, métodos moleculares para detecção e identificação, subtipagem, genómica e proteómica.

1.2. TAXONOMIA

Todos os organismos do género *Cryptosporidium* são seres eucariotas intracelulares, pertencentes ao reino Protozoa, cuja classificação tem por base as suas características fenotípicas, ciclo de vida e local de infecção no hospedeiro (O'Donoghue, 1995). Pertencem ao filo Apicomplexa (formas infectantes com complexo apical, destinado à invasão do hospedeiro), classe Conoidasida (reprodução sexuada e assexuada, locomoção das formas infectantes feita por flexão, deslizamento ou ondulação), subclasse Coccidiasina (ciclo de vida com merogonia, gametogonia e esporogonia), ordem Eucoccidiorida (presença de merogonia, infecta hospedeiros vertebrados e invertebrados), subordem Eimeriorina (desenvolvimento independente de gâmetas masculino e feminino), família Cryptosporidiidae (ciclo de vida monoxénico com formas de desenvolvimento localizadas sob a membrana da célula hospedeira, oocistos contendo quatro esporozoítos, microgâmetas não flagelados) (Current & Garcia, 1991; Tzipori & Ward, 2002; Fayer, 2008) (figura 1).

Nos últimos anos, a classificação taxonómica de *Cryptosporidium* tem sido objecto de grande debate, pelo facto deste parasita apresentar algumas características diferentes das dos microrganismos da subclasse Coccidiasina, principalmente: a) localização intracelular mas extracitoplasmática das formas de desenvolvimento endógeno; b) ligação do parasita à célula hospedeira com envolvimento de um organelo alimentador na base do vacúolo parasitóforo; c) presença de dois tipos distintos de oocistos, sendo um deles responsável pelo processo de auto-infecção; d) reduzido tamanho dos oocistos e ausência de estruturas morfológicas, como o esporocisto e o apicoplasto; e) insensibilidade aos fármacos utilizados no combate a outros coccídeos; f) resposta imune do hospedeiro; g) e diferenças metabólicas (Carreno *et al.*, 1999; Tzipori & Ward, 2002; Abrahamsen *et al.*, 2004). Além disso, estudos de análise filogenética com base na sequência do gene que codifica a subunidade pequena do ácido ribonucleico ribossómico ou SSU rRNA (do inglês “small subunit ribosomal ribonucleic acid”) têm mostrado que as espécies de *Cryptosporidium*, não só constituem um grupo separado dos restantes coccídeos, como se encontram geneticamente mais próximas dos gregarinas (subclasse Gregarinasina – parasitas de artrópodes, anelídeos e moluscos) do que dos coccídeos (Carreno *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000; Barta & Thompson, 2006). Estudos recentes em *C. parvum* e *Cryptosporidium andersoni*

revelaram a presença de formas de desenvolvimento extracelulares com características semelhantes às de alguns gregarinas, sustentando a hipótese de grande afinidade entre estes e *Cryptosporidium* (Hijjawi *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2005). Para além disso, ainda não existe tratamento activo para a criptosporidiose, pelo que estes estudos apontam para a necessidade de outras estratégias experimentais que permitam esclarecer a posição do género *Cryptosporidium* dentro do filo Apicomplexa. A necessidade de fármacos mais eficazes no tratamento da criptosporidiose, assim como o desenvolvimento de métodos de detecção imunológicos e de biologia molecular dotados de maior especificidade, são condições essenciais para ajudar a esclarecer as questões que se formulam, do mesmo modo que poderão auxiliar na detecção de situações cujo resultado é falso positivo, devido a reacções cruzadas com os géneros até aqui mencionados (Carreno *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2005).

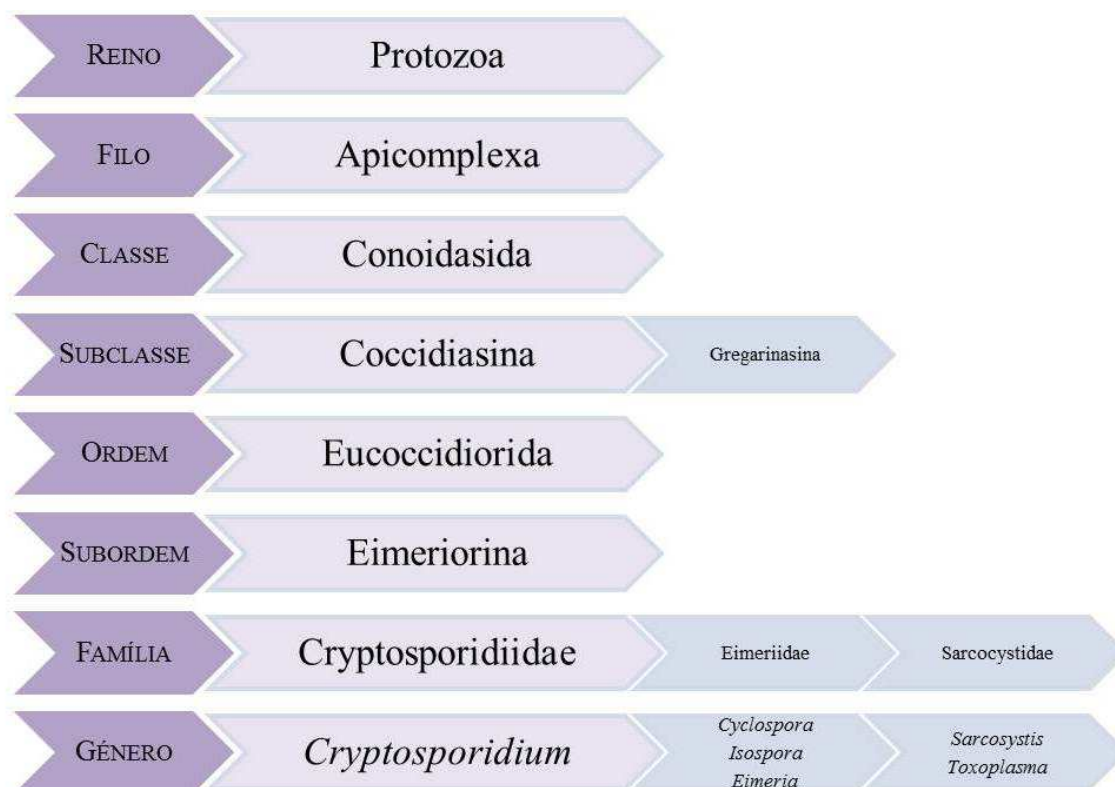


FIGURA 1. Representação esquemática abreviada da classificação taxonómica de *Cryptosporidium* [Adaptado de Zhu *et al.* (2000) e de Fayer (2008)].

O género *Cryptosporidium* possui características morfológicas e biológicas específicas, no entanto, a classificação e definição ao nível da espécie tem sido o grande desafio colocado aos taxonomistas e epidemiologistas. Muitas das espécies de coccídeos foram identificadas e caracterizadas unicamente com base nas características morfológicas dos respectivos oocistos. Devido ao facto dos oocistos das várias espécies de *Cryptosporidium* serem indistinguíveis entre si, a morfologia por si só, não é suficiente para a caracterização da espécie. De entre as 21 novas espécies descritas após as descobertas por Tyzzer (*C. muris* [em roedores] e *C. parvum* [em humanos e gado]), apenas mais 14 são hoje consideradas válidas, nomeadamente *C. meleagridis* (em perús), *Cryptosporidium wrairi* (em porquinhos-da-índia), *Cryptosporidium felis* (em gatos), *Cryptosporidium baileyi* (em galinhas), *Cryptosporidium saurophilum* (em lagartos), *C. andersoni* (em gado), *Cryptosporidium canis* (em cães), *Cryptosporidium hominis* (em humanos), *Cryptosporidium molnari* (em peixes), *Cryptosporidium serpentis* (em cobras), *Cryptosporidium bovis* (em bovinos), *Cryptosporidium scophthalmi* (em peixes), *Cryptosporidium suis* (em suínos), e *Cryptosporidium galli* (em aves) (Tyzzer, 1907; Tyzzer, 1912; Slavin, 1955; Vetterling *et al.*, 1971; Iseki, 1979; Levine, 1980; Current *et al.*, 1986; Koudela & Modrý, 1998; Pavlasek, 1999; Lindsay *et al.*, 2000; Fayer *et al.*, 2001; Morgan-Ryan *et al.*, 2002; Alvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla, 2002; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2005). O quadro I sintetiza as 16 espécies de *Cryptosporidium* actualmente consideradas válidas, com indicação da dimensão dos respectivos oocistos, hospedeiros onde, até à data, foram encontradas, e localização preferencial no organismo dos mesmos.

O conceito biológico de espécie refere-se a grupos de populações naturais, compostas por indivíduos férteis entre si, que produzem descendência fértil e que estão reprodutivamente isolados de outros grupos semelhantes. Contudo, este conceito tem sido difícil de aplicar, quando se tentam definir as espécies de *Cryptosporidium*. Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular têm constituído uma preciosa ajuda na clarificação da confusão estabelecida em redor da definição das espécies do género *Cryptosporidium*. Como resultado de vários estudos, tem-se conseguido descrever as características estruturais, a especificidade de hospedeiros e a histopatologia destes parasitas, relativos a cada espécie acima referida. Porém, a impossibilidade de

criopreservação e de propagação contínua dos criptosporídeos *in vitro*, inviabiliza a realização de estudos de cruzamento genético entre os isolados, reflectindo-se na ausência de isolados de referência que representem diferentes espécies ou genótipos. Alguns autores defendem que a caracterização das espécies de *Cryptosporidium* deve ser feita através de uma abordagem polifásica, a qual, até à data, tem sido aplicada apenas a um número restrito de isolados. Esta caracterização integra informação relativa à morfologia (diferenças no tamanho, forma e estrutura dos oocistos), genética (diferenças nas sequências de nucleótidos de genes bem caracterizados, que codificam para ácidos nucleicos e proteínas estruturais e funcionais), e biologia do parasita (especificidade do hospedeiro e localização nos diferentes órgãos, patogenicidade, virulência e intensidade da excreção de oocistos). Neste sentido, diversos investigadores propuseram quatro critérios básicos que devem ser considerados, quando se trata de nomear e validar novas espécies de *Cryptosporidium*: i) realização de estudos morfométricos dos oocistos; ii) caracterização genética da espécie; iii) demonstração de natural e, sempre que possível, pelo menos alguma especificidade experimental no hospedeiro; iv) e estar em conformidade com as regras de ICZN (do inglês “International Commission on Zoological Nomenclature”).

A abordagem polifásica das espécies de *Cryptosporidium* poderá constituir uma ferramenta indispensável para o trabalho de médicos, veterinários, epidemiologistas, e restantes profissionais de saúde, permitindo-lhes responder rapidamente a questões sobre a patogenicidade e a virulência das várias espécies, e o seu potencial risco para a saúde pública. Desta forma, o conhecimento preciso da identidade de um parasita, e a compreensão da sua variação dentro de um grupo particular, é também crucial para o desenvolvimento de vacinas e de novos métodos de diagnóstico (Fayer *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2000; Egyed *et al.*, 2002; Egyed *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004a).

QUADRO I. Espécies de *Cryptosporidium*. Síntese das 16 espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas, com indicação do tamanho médio dos oocistos [micrómetros (µm)], dos hospedeiros e da localização preferencial do parasita no organismo do hospedeiro (Egyed *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004a; Ryan *et al.*, 2004; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2005).

ESPÉCIE	TAMANHO MÉDIO OOCISTOS (µm)	HOSPEDEIROS		LOCALIZAÇÃO PREFERENCIAL	AUTOR
		PRINCIPAIS	OUTROS		
<i>C. muris</i>	5,6 x 7,4	roedores, camelos	humanos	estômago	Tyzzer, 1907
<i>C. andersoni</i>	5,5 x 7,4	bovinos, camelos	ovinos	abomaso	Lindsay <i>et al.</i> , 2000
<i>C. parvum</i>	4,5 x 5,5	bovinos, ovinos, caprinos, humanos	roedores, suínos, veados	intestino	Tyzzer, 1912
<i>C. hominis</i>	4,5 x 5,5	humanos, macacos	dugongos, ovinos	intestino delgado	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>C. wrairi</i>	4,5 x 5,2	porquinhos-da-índia		intestino delgado	Vetterling <i>et al.</i> , 1971
<i>C. felis</i>	4,5 x 5,0	gatos	humanos, bovinos	intestino delgado	Iseki, 1979
<i>C. canis</i>	5,0 x 4,7	cães	humanos, raposas	intestino delgado	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. suis</i>	5,1 x 4,4	suínos	humanos	intestino delgado	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>C. bovis</i>	4,5 x 5,1	bovinos	ovinos	intestino delgado	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>C. meleagridis</i>	4,7 x 4,9	perús, humanos	papagaios	intestino	Slavin, 1955
<i>C. baileyi</i>	4,6 x 6,2	galinhas, perús	outras aves	cloaca, bolsa de Fabricius, tracto respiratório	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>C. galli</i>	8,2 x 6,3	tentilhões, galinhas, tetraz		proventrículo	Pavlassek, 1999
<i>C. serpentis</i>	5,2 x 6,1	cobras, lagartos		estômago	Levine, 1980
<i>C. saurophilum</i>	4,7 x 5,0	lagartos	cobras	intestino, cloaca	Koudela & Modry, 1998
<i>C. molnari</i>	4,7 x 4,5	peixes		estômago	Alvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>C. scophthalmi</i>	3,8 x 4,3	peixes		intestino delgado	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004

1.3. CICLO DE VIDA

Os parasitas do género *Cryptosporidium* possuem um ciclo de vida monoxénico, que ocorre totalmente no trato gastrointestinal de um único hospedeiro. As características únicas que distinguem este género dos restantes coccídeos referem-se, principalmente, à resistência aos fármacos, à capacidade de auto-infecção e à localização particular no interior de membrana da célula hospedeira.

A forma do desenvolvimento de *Cryptosporidium* fundamental é o oocisto, que após ser excretado nas fezes do hospedeiro infectado, é responsável pela contaminação ambiental e transmissão da doença. O oocisto maduro possui no seu interior quatro esporozoítos, haplóides, rodeados por uma parede de duas camadas distintas, altamente resistente. Esta parede é única, na medida em que possui uma sutura numa das extremidades, que ao sofrer ruptura durante a excitação (figura 2 e figura 3a), permite a libertação dos esporozoítos (figura 3b), mediante determinadas condições de temperatura, pH e presença de enzimas pancreáticas no lúmen intestinal (Petry & Harris, 1999; Spano & Crisanti, 2000). Esporozoítos e merozoítos constituem as formas infectantes, sendo os primeiros, responsáveis pela adesão e invasão das células do epitélio intestinal. Por um processo ainda pouco conhecido, mediado por proteínas produzidas pelo esporozoíto e por receptores específicos existentes na célula hospedeira, determinados organelos do complexo apical (roptrias, micronemas e grânulos densos) localizado na extremidade anterior do esporozoíto, iniciam o processo de invasão dos enterócitos. Segue-se um profundo rearranjo estrutural no citoesqueleto destas células, ao mesmo tempo que a sua membrana celular envolve o esporozoíto, formando um vacúolo parasitóforo. Tal, confere ao parasita uma posição intracelular mas extracitoplasmática, passando a designar-se de trofozoíto (figura 3c) (Spano & Crisanti, 2000; Fayer, 2008). Devido a esta localização periférica relativamente ao citoplasma da célula hospedeira, todas as formas intracelulares (trofozoítos, merontes tipo I e tipo II, gametócitos, zigotos e oocistos imaturos), excepto merozoítos e microgâmetas, desenvolvem na base do vacúolo parasitóforo uma estrutura designada de organelo alimentador (do inglês “feeder organelle”), que separa os citoplasmas da célula hospedeira e do parasita e que é responsável pela entrada de nutrientes (Lumb *et al.*, 1988; Tzipori & Ward, 2002; Smith *et al.*, 2005).

A fase seguinte corresponde à multiplicação assexuada, que ocorre no interior do vacúolo parasitóforo, durante a qual o trofozoíto sofre três divisões nucleares (merogonia), originando os merontes tipo I (figura 3d) que contêm seis a oito merozoítos haplóides, posteriormente libertados para o lúmen intestinal (figura 3e). Cada novo merozoíto invade uma célula epitelial adjacente e, após maturação e duas ou três gerações de merogonia, origina, respectivamente, um meronte tipo I (processo de auto-infecção) ou um meronte tipo II (figura 3f). Este último contém quatro merozoítos (figura 3g) que, ao infectarem novas células, se diferenciam em microgamontes (figura 3h) e macrogamontes (figura 3i), respectivamente, células masculinas e células femininas, dando-se assim início ao ciclo sexuado (gametogonia). Os microgamontes tornam-se multinucleados, e incorporam cada núcleo num microgâmeta, que vai fertilizar o macrogamonte, formando o zigoto (figura 3j). Este sofre duas divisões nucleares (esporogonia) e origina o oocisto, que contém no seu interior quatro esporozoítos. Durante o processo de esporogonia, produzem-se dois tipos de oocistos, os de parede grossa (cerca de 80%), excretados nas fezes sob a forma infectante/esporeulados (figura 3l) e que após ingestão vão infectar novos hospedeiros susceptíveis, e os de parede fina (cerca de 20%), que permanecem no hospedeiro e constituem nova fonte de auto-infecção (figura 3m) (O'Donoghue, 1995; Tzipori & Ward, 2002; Carey *et al.*, 2004; Fayer, 2008).

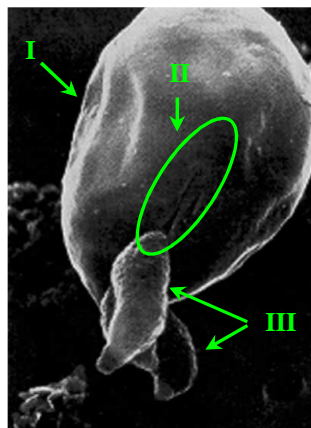


FIGURA 2. Processo de excistância em *Cryptosporidium*. Representação do processo de excistância dos quatro esporozoítos (III) para o exterior do oocisto (I) de *Cryptosporidium*, através da sutura (II) localizada na membrana, numa das extremidades da estrutura [Adaptado de Smith *et al.* (2005)].

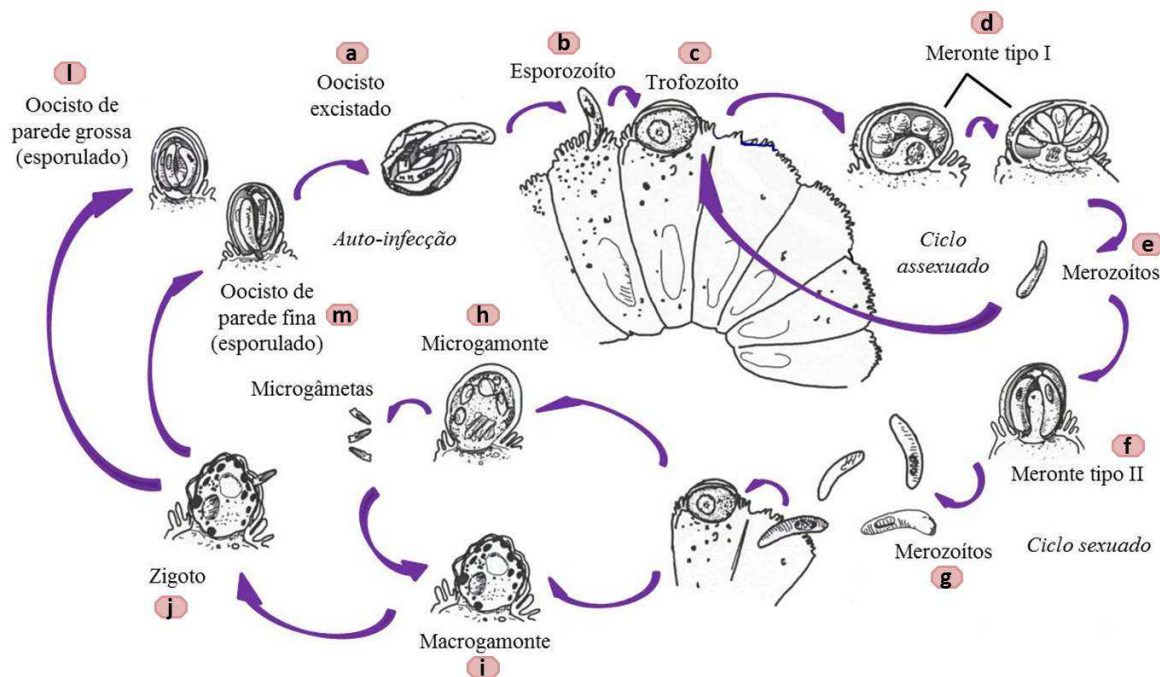


FIGURA 3. Ciclo de vida de *Cryptosporidium*. Representação esquemática do ciclo de vida de *Cryptosporidium*, com indicação das três fases: auto-infecção, ciclo assexuado e ciclo sexuado (Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>, acessado a 29 de Agosto de 2012).

Dependendo da espécie de *Cryptosporidium*, a forma dos oocistos varia entre redonda a oval, com dimensões que oscilam entre 4 a 8 μm . A parede é uma estrutura trilaminar, constituída por uma membrana interna e externa, sendo totalmente contínua excepto num dos pólos, no qual existe uma sutura que se abre durante a excistação, para que ocorra a libertação dos esporozoítos para o exterior do oocisto. No interior desta estrutura, existem quatro esporozoítos vermiformes e um corpo residual, que contém vacúolos lipídicos, grânulos de amilopectina, inclusões cristalinas e ribossomas (figura 4) (Petry & Harris, 1999; Petry, 2004). Apesar desta estrutura particular e bem descrita, encontra-se documentada a presença de estruturas extracelulares semelhantes aos gamontes de gregarinas, em culturas celulares de *C. parvum*. Estes dados sustentam a tese que aponta para a grande afinidade que existe entre gregarinas e *Cryptosporidium*, reforçando a necessidade de revisão do ciclo de vida deste último e a sua classificação taxonómica. Contudo, tal só poderá ser feito após a realização de uma série de estudos

in vivo e *in vitro*, e após a análise da ultra-estrutura das formas de desenvolvimento observadas (Hijjawi *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2005).

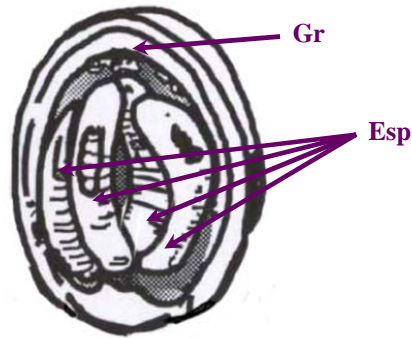


FIGURA 4. Oocisto de *Cryptosporidium*. Representação esquemática de um oocisto de *Cryptosporidium*, no interior do qual se podem distinguir os grânulos de amilopectina (Gr) e os quatro esporozoítos (Esp) (Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>, acedido a 29 de Agosto de 2012).

1.4. EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOSPORIDIOSE

A criptosporidiose é uma doença ubiquitária, descrita mundialmente em mais de 40 países distribuídos pelos seis continentes (Current & Garcia, 1991; Fayer *et al.*, 2000; Kosek *et al.*, 2001; Waldron *et al.*, 2011). Existem diversos factores que facilitam a ampla transmissão de *Cryptosporidium*, com influência directa na epidemiologia destes parasitas:

a) A elevada robustez dos oocistos confere-lhes resistência aos processos químicos e físicos utilizados no tratamento da água, nomeadamente o cloro e os ácidos, o que facilita a sua disseminação em águas recreativas e de consumo público (Dillingham *et al.*, 2002). Apesar de não se multiplicar em alimentos, este parasita pode ser transmitido através destes, tais como a maçã, mantendo-se no sumo caso estas estejam contaminadas (Millard *et al.*, 1994);

b) A dimensão relativamente reduzida, a baixa velocidade de sedimentação e a elevada capacidade de flutuação dos oocistos facilitam o seu transporte e a sua dispersão no ambiente, dificultando os processos de filtração/retenção dos oocistos e sendo necessários procedimentos específicos para tratamento das águas (Dillingham *et al.*, 2002);

c) A dose infectante para o Homem é reduzida, traduzindo-se em elevadas taxas de infecção. Estudos efectuados em voluntários saudáveis com três isolados distintos de *C. parvum* mostraram que a dose infectante parece variar entre nove e 1042 oocistos (Okhuysen *et al.*, 1999). Extrapolações efectuadas ao surto de Milwaukee, em 1993, pela aplicação de um modelo matemático dinâmico do processo de infecção, sugeriram que a dose infectante possa ter sido, para algumas pessoas, inferior a 10 oocistos (Eisenberg *et al.*, 1998);

d) Os oocistos são excretados na forma infecciosa, isto é, na forma esporulada, o que significa que a infecção de novos hospedeiros pode ser imediata, nomeadamente através do contacto directo pessoa-a-pessoa (transmissão antroponótica). Este é um aspecto determinante na epidemiologia da infecção por *Cryptosporidium*, particularmente relacionado com a eventual excreção de oocistos após o desaparecimento dos sintomas (Chappell *et al.*, 1996; Dillingham *et al.*, 2002);

e) Algumas espécies de *Cryptosporidium*, particularmente *C. parvum*, não têm um hospedeiro específico, o que associado à distribuição ubiquitária do parasita, tem

contribuído para o elevado número de reservatórios e para o conseqüente aumento do potencial zoonótico do parasita (Dillingham *et al.*, 2002);

f) O ciclo de vida do parasita é designado de monoxénico, uma vez que é completado num único hospedeiro. Ao fim de três dias (pode variar entre um a oito dias), o ciclo de desenvolvimento de *Cryptosporidium* está completo (Meinhardt *et al.*, 1996);

g) Os oocistos são excretados em grandes quantidades, principalmente devido aos múltiplos ciclos de auto-infecção que ocorrem no hospedeiro, preconizados pelos merontes tipo I e pelos oocistos de parede fina (Casemore, 1990);

h) A existência de várias vias de transmissão (antroponótica, zoonótica, alimentar, hídrica e através de vectores) dos oocistos de *Cryptosporidium*, que podem ocorrer simultaneamente, aumenta a eficiência da disseminação do parasita (Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002; Xiao, 2009).

1.4.1. CRIPTOSPORIDIOSE NO HOMEM

Apesar da enorme importância que a criptosporidiose representa para a saúde pública, ainda não existe uma verdadeira estimativa acerca do número de infectados anualmente. De acordo com o CDC, os actuais valores de prevalência encontram-se subestimados, por diversas razões como o facto de a criptosporidiose não ser uma doença de declaração obrigatória; existência de deficiências na declaração de todos os casos confirmados da doença às entidades nacionais e internacionais, pelos laboratórios e médicos; deficiências na procura de assistência médica pelos doentes com diarreia; não familiarização desta doença por alguns médicos e ausência de requisição da pesquisa deste parasita nas fezes; muitos laboratórios não efectuem as técnicas adequadas para o diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* ou, ainda, porque muitas das infecções assintomáticas não são investigadas (Dietz *et al.*, 2000). Os relatórios do CDC permitem caracterizar a epidemiologia da criptosporidiose nos EUA e entre 1999 e 2002, o número de casos de criptosporidiose humana declarados anualmente foi de 2.769, 3.128, 3.787 e 3.016, respectivamente (Hlavsa *et al.*, 2005). Contudo, os autores acreditam que estes valores estejam subestimados, pelo que os dados reportados quase uma década depois (2009 e 2010) apresentam maior número de casos de

criptosporidiose, 7.656 e 8.951, respectivamente (Yoder *et al.*, 2012). Os estudos epidemiológicos indicam que a criptosporidiose humana se encontra distribuída por todo o mundo, nos vários continentes. Por exemplo, a prevalência de oocistos nas fezes de pessoas com gastroenterite descrita em África, Ásia, Austrália, América do Sul e Central (3-20%) é superior aos valores registados na Europa e na América do Norte (1-2% e 0,6-4,3%, respectivamente) (Current & Garcia, 1991).

Esta infecção é bastante comum nas regiões onde a doença é endémica, particularmente zonas pobres, com elevada densidade populacional, reduzidas condições de saneamento e baixa qualidade da água de abastecimento. A criptosporidiose é igualmente problemática nas zonas rurais, onde existe um estreito contacto com os animais infectados (Fayer *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2002). Os países em desenvolvimento apresentam uma elevada prevalência desta doença comparativamente aos países industrializados, 6,1% e 2,2%, respectivamente. Nos primeiros, a exposição ao parasita é frequente, pelo que a infecção torna-se assintomática em consequência do desenvolvimento de imunidade à mesma (Casemore, 1990; Current & Garcia, 1991), enquanto nos países industrializados, os surtos de criptosporidiose são sobretudo esporádicos (Guerrant, 1997; Leav *et al.*, 2003).

Os imunocomprometidos, nomeadamente doentes com sida, sujeitos a quimioterapia, transplantados e com alterações hematológicas, assim como crianças e idosos, constituem os grupos mais susceptíveis à criptosporidiose, nos quais as infecções assintomáticas e as sintomáticas de causa desconhecida desempenham um importante papel na epidemiologia da doença (Fayer *et al.*, 2000; Hunter & Nichols, 2002; Chalmers & Davies, 2010). Os infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH) apresentam elevados valores de prevalência de infecção por *Cryptosporidium*, em ambos os países em desenvolvimento e industrializados. Nos primeiros, onde o acesso à terapêutica antirretrovírica poderá não existir (Ajajampur *et al.*, 2008), os valores ascendem aos 24%, enquanto nos países industrializados esta percentagem diminui para 14% (Guerrant, 1997; Dillingham *et al.*, 2002). Em Portugal, apesar da informação disponível sobre a criptosporidiose ainda ser escassa, o primeiro surto, descrito por Melo Cristino *et al.* (1988), afectou 27% das crianças e uma educadora do infantário do Hospital de Santa Maria, em Lisboa. Matos *et al.* (1998) publicaram os resultados de um estudo observacional longitudinal, efectuado entre 1988 e 1997 no mesmo hospital,

em 465 pessoas infectadas por VIH com diarreia, cujo valor de prevalência da criptosporidiose foi de 8% (36/465), muito próximo da percentagem global de infecção por *Cryptosporidium* (6,6%) encontrada a nível europeu (Pedersen *et al.*, 1996). Sorvillo *et al.* (1994) efectuaram uma extensa análise referente a um período de 10 anos (1983-1992) em Los Angeles, EUA, e detectaram, de entre 16.953 pessoas infectadas por VIH, cerca de 638 (3,8%) casos de criptosporidiose.

Apesar de a criptosporidiose apresentar maior expressão na população com imunodeficiência causada por VIH, os doentes com neoplasias hematológicas também se encontram em risco (Gentile *et al.*, 1991). Tanyuksel *et al.* (1995) encontraram uma prevalência da infecção por *Cryptosporidium* de 17% (18/106), num grupo de doentes sujeitos a terapêutica imunossupressora. A prevalência de criptosporidiose também se tem mostrado consideravelmente elevada nos doentes hemodialisados, com valores na ordem dos 11,5% (12/104) (Seyrafián *et al.*, 2006). As imunodeficiências primárias, que afectam linfócitos T e B, as imunodeficiências relacionadas com os anticorpos, assim como as imunodeficiências do sistema de complemento e as alterações relacionadas com o número e função dos fagócitos, constituem outras patologias associadas a um maior risco de criptosporidiose grave (Sloper *et al.*, 1982; Hayward *et al.*, 1997; Kutukculer *et al.*, 2003). Neste contexto, as crianças têm sido o grupo mais afectado, devido à imaturidade do respectivo sistema imunitário e à particular vulnerabilidade à infecção por *Cryptosporidium*, associada aos comportamentos que lhes são característicos e que favorecem a transmissão (hábitos de higiene deficientes, uso de fraldas e levar as mãos sujas à boca).

Nos países em desenvolvimento, os valores de seroprevalência da infecção por *Cryptosporidium* registam-se desde a infância e não maioritariamente a partir da idade adulta, como ocorre nos países industrializados. Nos primeiros, a prevalência da criptosporidiose nas crianças com diarreia é superior a 12%, contrariamente aos países industrializados, cujos valores rondam os 7% (Chen *et al.*, 2002). Numa zona rural da China, Zu *et al.* (1994) verificaram que 50-75% das crianças com idades compreendidas entre os oito e os 13 anos apresentavam elevada resposta serológica anti-*Cryptosporidium* do tipo imunoglobulina (Ig) G, e mais de 90% das crianças de uma região empobrecida do Brasil, apresentavam evidência serológica de infecção por *Cryptosporidium* durante o primeiro ano de vida. Na Guatemala, em crianças entre o

primeiro e o terceiro ano de idade, observou-se uma correlação positiva de 27-73%, entre a prevalência de IgG anti-*Cryptosporidium* e o aumento da idade (Steinberg *et al.*, 2004). Nos países em desenvolvimento, a criptosporidiose constitui uma das causas mais frequentes de diarreia persistente em crianças até aos dois anos de idade. Os episódios de diarreia ocorrem com maior frequência e durante mais tempo, principalmente nas crianças mal nutridas. Neste sentido, diversos estudos têm sugerido a má nutrição como um importante determinante da criptosporidiose, contudo, não foi ainda possível concluir se a má nutrição é uma consequência da parasitose ou se esta acontece como consequência do estado nutricional (Macfarlane & Horner-Bryce, 1987; Sallon *et al.*, 1988; Casemore, 1990; Newman *et al.*, 1999). Alguns autores demonstraram também, que a diarreia, as infecções repetidas e a má nutrição em crianças até aos dois anos de idade nas regiões em desenvolvimento, poderão surtir importantes consequências a longo prazo no seu crescimento (altura e peso), desenvolvimento cognitivo e rendimento escolar (Molbak *et al.*, 1997; Guerrant *et al.*, 2002), e expressar importantes repercussões negativas no futuro, designadamente, ao nível do aumento dos custos sociais, económicos e de produtividade, traduzindo-se na pobreza e no subdesenvolvimento (Guerrant *et al.*, 2002).

Nos países industrializados, a infecção é mais comum em crianças com idade inferior a cinco anos, podendo, no entanto, também ocorrer nos adultos. Na maior parte dos casos, a transmissão ocorre por via fecal-oral, na sequência do contacto com crianças infectadas no seio familiar, ou nas creches, do contacto com animais infectados, ou de viagens para zonas endémicas (Casemore, 1990). Nos EUA e na Austrália, a criptosporidiose é uma das infecções humanas mais prevalentes, transmitida essencialmente através da via hídrica, todavia, na Europa, a importância desta parasitose ainda é bastante variável. O Reino Unido constitui a excepção na Europa, uma vez que a maioria dos surtos de origem hídrica documentados ocorreu neste país (Smith & Rose, 1998).

Os estudos seroepidemiológicos sugerem uma boa indicação do nível de exposição de uma determinada população a *Cryptosporidium*, contudo, não podem ser usados como indicadores de infecções recentes ou passadas, nem de infecções sintomáticas ou assintomáticas (O'Donoghue, 1995). Estudos efectuados nos EUA sugerem que cerca de 20% da população deste país teve infecção por *Cryptosporidium*

na adolescência, mais concretamente, até aos 21 anos, apresentando ainda, resposta serológica do tipo IgG para dois grupos de antígenos específicos (15/17 e 27 kDa) de *Cryptosporidium* (Kuhls *et al.*, 1994; Frost *et al.*, 2004). Tem sido igualmente proposto que a percentagem de seropositividade aumenta com a idade, atingindo valores superiores a 50% nos indivíduos com idade superior a 21 anos, e na população com idade superior a 70 anos, a evidência serológica de infecção anterior é de 70%, sugestivo de que a infecção parece ocorrer mais frequentemente do que é descrito pelos sistemas de vigilância, sendo maioritariamente assintomática ou resultar em sintomatologia ligeira (Frost *et al.*, 2004). Os valores de prevalência da infecção por *Cryptosporidium* para os grupos de antígenos acima referidos, encontrados na população adulta em duas cidades do Canadá, são semelhantes aos acima descritos, entre 69-88% em Collingwood e 45% em Toronto (Frost *et al.*, 2000a). Também em duas das maiores cidades da Austrália foram detectadas percentagens muito semelhantes às descritas nos adultos, entre 56,7-66,3%, em Sidney, e 61,5-77,9%, em Melbourne (Frost *et al.*, 2000b). Numa cidade da Rússia, foram descritas percentagens de seropositividade entre 68-88% na população adulta (Egorov *et al.*, 2004). Na Europa, numa cidade do norte de Itália, os valores de resposta serológica do tipo IgG situaram-se entre 62-83%, análogos aos descritos noutras regiões do mundo (Frost *et al.*, 2000c).

Existem evidências de que os doentes infectados por *Cryptosporidium*, que exibam resposta serológica aos grupos de antígenos acima referidos, 15/17 e 27 kDa, apresentem risco reduzido de desenvolvimento de doença entérica (Frost *et al.*, 2005a). Neste contexto, um estudo recente em quatro regiões da República Checa mostrou uma resposta serológica elevada aos grupos de antígenos acima referidos, entre 33-72% da população estudada. Os autores sugerem que estes valores possam estar fortemente associados com infecções anteriores, resultando numa imunidade protectora contra a criptosporidiose, sendo esta uma das razões mais plausíveis que explica a ausência de surtos de criptosporidiose derivados da ingestão de água contaminada com oocistos de *Cryptosporidium* nesta região (Kozisek *et al.*, 2008).

Os estudos coprológicos apresentam resultados de prevalência bastante inferiores aos encontrados nos estudos serológicos. Na Europa, os estudos disponíveis sobre a criptosporidiose humana são escassos, no entanto, destacam-se os trabalhos efectuados na Inglaterra e País de Gales, na Holanda e num grupo de países do norte da

Europa. Na Inglaterra e País de Gales, entre 1985 e 1987, 16 laboratórios de saúde pública efectuaram um estudo que envolveu 62.421 pessoas imunocompetentes com diarreia, onde foi encontrada uma prevalência de criptosporidiose de 2% (1295 pessoas) (Public Health Laboratory Service Study Group, 1990). Na Holanda, entre 1996 e 1999, de Wit *et al.* (2001) detectaram a existência de oocistos nas fezes de 2,1% (18/857) dos doentes com gastroenterite, ao contrário dos indivíduos sem queixas gastroenterológicas, nos quais o valor decresceu para 0,2% (1/574). Horman *et al.* (2004) realizaram um estudo de meta-análise que teve por base dados epidemiológicos de 13 trabalhos efectuados num conjunto de países do norte da Europa (Dinamarca, Finlândia, Noruega e Suécia). Apesar da prevalência de *Cryptosporidium* ter sido inferior na população assintomática (0,99%) quando comparada com a população sintomática (2,91%), observou-se um maior número de casos assintomáticos (73,4%; 9.190/12.530) do que sintomáticos (26,6%; 3.340/12.530).

A maioria dos episódios de diarreia do viajante é autolimitada e os microrganismos não causam alterações graves ao nível do intestino (Okhuysen, 2001; Glaeser *et al.*, 2004; Lazensky *et al.*, 2008). No entanto, a associação entre as viagens ao estrangeiro e a diarreia por *Cryptosporidium* tem sido descrita em diversos estudos, principalmente, nos viajantes que visitam os países onde a criptosporidiose é endémica, apresentando elevado risco de contrair a infecção, em consequência do consumo de alimentos crus (marisco, vegetais e fruta), da ingestão de água da torneira ou de leite não pasteurizado, do contacto com água não tratada (rios, piscinas e lagos), e do contacto com pessoas infectadas (Ungar *et al.*, 1989; Agnamey *et al.*, 2010).

1.4.2. CRIPTOSPORIDIOSE NOS ANIMAIS

A infecção por microrganismos do género *Cryptosporidium* tem sido descrita numa grande variedade de animais domésticos e selvagens, sendo contudo, mais frequente em mamíferos, nos quais se encontram descritas mais de 155 espécies infectadas (O'Donoghue, 1995; Fayer, 2004).

O interesse por este parasita aumentou no domínio veterinário, não só devido às elevadas perdas económicas que a infecção por *Cryptosporidium* acarreta no sector da pecuária mas, principalmente, pelo facto de os animais poderem constituir fonte de

infecção para os humanos (Fayer, 2004; Ramirez *et al.*, 2004). A maioria das infecções descritas nos mamíferos afecta o gado doméstico, particularmente os vitelos, nos quais a prevalência de infecção é elevada (Matos, 2008). Os animais recém-nascidos são mais susceptíveis à infecção, adquirindo-a naturalmente entre as duas e quatro semanas de idade, e exibindo níveis elevados de morbilidade e mortalidade, sendo os adultos, frequentemente, portadores assintomáticos (de Graaf *et al.*, 1999). A sintomatologia mais severa é observada em animais não desmamados e inclui diarreia, desidratação, febre, apatia e dor abdominal. A excreção de oocistos é elevada, podendo exceder os 10^7 oocistos por grama de fezes, continuando mesmo após o cessar dos sintomas. Embora em percentagens inferiores às encontradas em recém-nascidos, a excreção de oocistos por vitelos desmamados e animais adultos tem sido observada com alguma frequência, ainda que sem evidência de diarreia (Fayer, 2008). Diversos estudos têm apontado valores de prevalência de infecção por *Cryptosporidium*, nos vitelos, entre 20% (21/104) (Olson *et al.*, 1997) e 52% (191/367), ao contrário dos animais adultos, cujos valores diminuem para 3,5% (26/736) (Sturdee *et al.*, 2003). Nos EUA, Santin *et al.* (2004) efectuaram um estudo longitudinal, no qual obtiveram uma prevalência de infecção por *Cryptosporidium* de 50,3% (253/503) em vitelos não desmamados até dois meses de idade, que diminuiu para 19,7% (92/468) em animais desmamados com idade entre os três e os 11 meses. Este estudo, que estabelece a existência de associação entre a idade e a prevalência de infecção por *Cryptosporidium* nestes animais, foi corroborado por outros trabalhos subsequentes, nos quais se verificou que nos vitelos com idade entre 12 e 24 meses, a prevalência foi de 11,9% (68/571) (Fayer *et al.*, 2006) e nos animais com mais de dois anos de idade, este valor reduziu para 5,7% (31/541) (Fayer *et al.*, 2007).

Embora não se encontre tão bem documentada, a infecção por *Cryptosporidium* também é comum em ovinos e caprinos, nos quais os aspectos clínicos são semelhantes aos acima descritos para os bovinos, sendo os animais adultos maioritariamente assintomáticos (de Graaf *et al.*, 1999). No mesmo estudo feito anteriormente em bovinos, Sturdee *et al.* (2003) mostraram que 6,4% (16/250) das ovelhas e 12,9% (33/255) dos cordeiros também apresentavam infecção por *Cryptosporidium*.

Nos suínos, a infecção é maioritariamente assintomática, sendo alvo de menos investigação e, deste modo, a informação epidemiológica documentada é mais escassa

(de Graaf *et al.*, 1999). Desconhece-se qual a sua contribuição para a infecção humana e para a contaminação ambiental, contudo, a infecção por *Cryptosporidium* tem sido descrita esporadicamente em várias regiões (Ramirez *et al.*, 2004). Suarez-Luengas *et al.* (2007) relatam uma prevalência de infecção por *Cryptosporidium* de 22,5% (32/142) em Espanha, e Kaminjolo *et al.* (1993) apresentam valores de 19,6% (134/683) em Trinidad e Tobago. Esta infecção parece ser mais prevalente nos animais com um a dois meses de idade (Ramirez *et al.*, 2004) e um estudo feito na Austrália por Johnson *et al.* (2008a) corrobora este facto, ao apresentar valores de prevalência de infecção em leitões não desmamados (11 dias a três semanas de idade) e desmamados (quatro semanas a seis meses de idade) de 10,6% (13/123) e de 32,7% (51/156), respectivamente.

A infecção por *Cryptosporidium* tem sido descrita em mais de 30 espécies de aves domésticas, incluindo galinhas, perus, patos, gansos, codornizes, faisões e pavões, contudo, são poucos os estudos que documentam a prevalência desta infecção nestes animais. Actualmente, apenas duas espécies de *Cryptosporidium* são reconhecidas como válidas nas aves: *C. meleagridis*, descrito em perus (Slavin, 1955), e *C. baileyi*, isolado em galinhas (Current *et al.*, 1986). De modo semelhante ao que acontece nos mamíferos, também as aves mais jovens aparentam maior susceptibilidade à infecção do que as adultas (Goodwin *et al.*, 1988; Lindsay *et al.*, 1988; Sreter *et al.*, 1995).

A importância da criptosporidiose nos animais de companhia, particularmente cães e gatos, ainda não é muito clara, no entanto, a sua relevância em saúde pública reside no facto de poderem constituir fontes de transmissão zoonótica para os humanos. Após a primeira descrição das espécies bem adaptadas ao cão e ao gato, respectivamente, *C. canis* e *C. felis*, outros casos de criptosporidiose têm sido documentados (Iseki, 1979; Fayer *et al.*, 2001). Nos cães adultos, a infecção é, na maioria das vezes, assintomática, excepto quando coexiste com outras patologias causadoras de imunossupressão, como a parvovirose (Robertson *et al.*, 2000; Denholm *et al.*, 2001).

As zoonoses cujo reservatório são os animais selvagens, constituem um enorme problema de saúde pública. A infecção por *Cryptosporidium* tem sido documentada em inúmeros animais silváticos e em cativeiro, contudo, os estudos propriamente ditos têm sido escassos e dispersos. Embora alguns autores tenham sugerido que estes animais

possam constituir eventuais reservatórios e fontes de infecção para os humanos e animais domésticos, desconhece-se a dimensão de tal contribuição (Matos, 2008). Chalmers *et al.* (1997) estudaram a prevalência de *Cryptosporidium* em três espécies de roedores, numa exploração agrícola e pecuária no Reino Unido, observando-se uma prevalência de 18,6% para *C. parvum* e de 6,4% para *C. muris*. Os autores concluíram que a coabitação destes pequenos mamíferos com o gado doméstico pode constituir um importante reservatório de *Cryptosporidium*, com elevado potencial de infecção para o homem e para os animais. Num estudo efectuado em várias zonas da província da Catalunha, em Espanha, foi analisada a ocorrência de *Cryptosporidium* em cinco espécies de roedores e duas espécies de insectívoros, tendo sido encontradas prevalências globais de 24,9% (110/442) para *C. parvum*, 2,9% (13/442) para *C. muris* e de 4,3% (19/442) para infecção por ambas as espécies (Torres *et al.*, 2000). A presença de *Cryptosporidium* tem sido estudada noutros animais, nomeadamente, javalis, gamos, veados, babuínos, zebras, búfalos e gnus. Contudo, os estudos epidemiológicos realizados nestes animais são escassos e, na grande maioria das vezes, são efectuados em pequenos grupos de animais em jardins zoológicos ou em reservas naturais (Pospischil *et al.*, 1987; Mtambo *et al.*, 1997; Deng & Cliver, 1999). Na Tapada Nacional de Mafra, em Portugal, Lourenço *et al.* (2000) detectaram oocistos de *Cryptosporidium* em 100% (12/12) dos gamos estudados, todos com idades compreendidas entre os nove meses e os quatro anos. Em Portugal, no Jardim Zoológico de Lisboa, estudou-se a população de ruminantes silvestres mantidos em cativeiro, relativamente à presença de *Cryptosporidium* spp. Cerca de 4% dos 196 animais em estudo tinham infecção por *Cryptosporidium*, e a análise morfométrica dos oocistos permitiu concluir que se tratava de *C. parvum* (Delgado *et al.*, 2003). No Jardim Zoológico de Barcelona, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de diversas espécies de primatas e herbívoros, confirmando-se deste modo, o estatuto de endemicidade relativo a este parasita no referido habitat (Gomez *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 2000). Estes autores concluíram ainda, que as características físicas das instalações, nas quais o parasita permaneceu viável e infeccioso, associado ao facto da transmissão inicial resultar da infecção crónica em alguns animais que constituíram posterior fonte de reinfecção para outros, foram os principais factores que contribuíram para a transmissão do parasita.

Muita da investigação efectuada para a presença de *Cryptosporidium* em animais selvagens concentrou-se em catalogar as espécies que são naturalmente susceptíveis a este parasita. Assim, a ausência de diferenças morfológicas entre as espécies de *Cryptosporidium* encontradas nos animais, resultou em informações imprecisas acerca da especificidade do hospedeiro e das espécies e genótipos do parasita que estavam, de facto, envolvidas na infecção. Apenas recentemente, com o desenvolvimento e crescente aplicação de métodos moleculares na genotipagem de amostras biológicas, os investigadores têm conseguido obter informação importante relativa aos hospedeiros, taxonomia, e potencial zoonótico deste género (Matos, 2008).

1.4.3. RESERVATÓRIOS E TRANSMISSÃO DA CRIPTOSPORIDIOSE

A criptosporidiose é transmitida por via fecal-oral, por intermédio do oocisto (forma infectante) de *Cryptosporidium* (figura 5). A transmissão ocorre quando um indivíduo susceptível ingere oocistos excretados por um hospedeiro infectado (humano ou animal), seja por contacto directo pessoa-a-pessoa (transmissão antroponótica) ou animal-pessoa (transmissão zoonótica) ou indirecto, através de alimentos (transmissão alimentar), de águas contaminadas (transmissão hídrica), e do transporte mecânico dos oocistos através de vectores (Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002; Xiao, 2009). Fundamental ainda, é o facto de os oocistos de *Cryptosporidium* apresentarem cinco determinantes epidemiológicos, relacionados com características biológicas particulares, decisivos para a sua dispersão e consequente dinâmica de transmissão das várias espécies, tal como se encontra apresentado no quadro II.

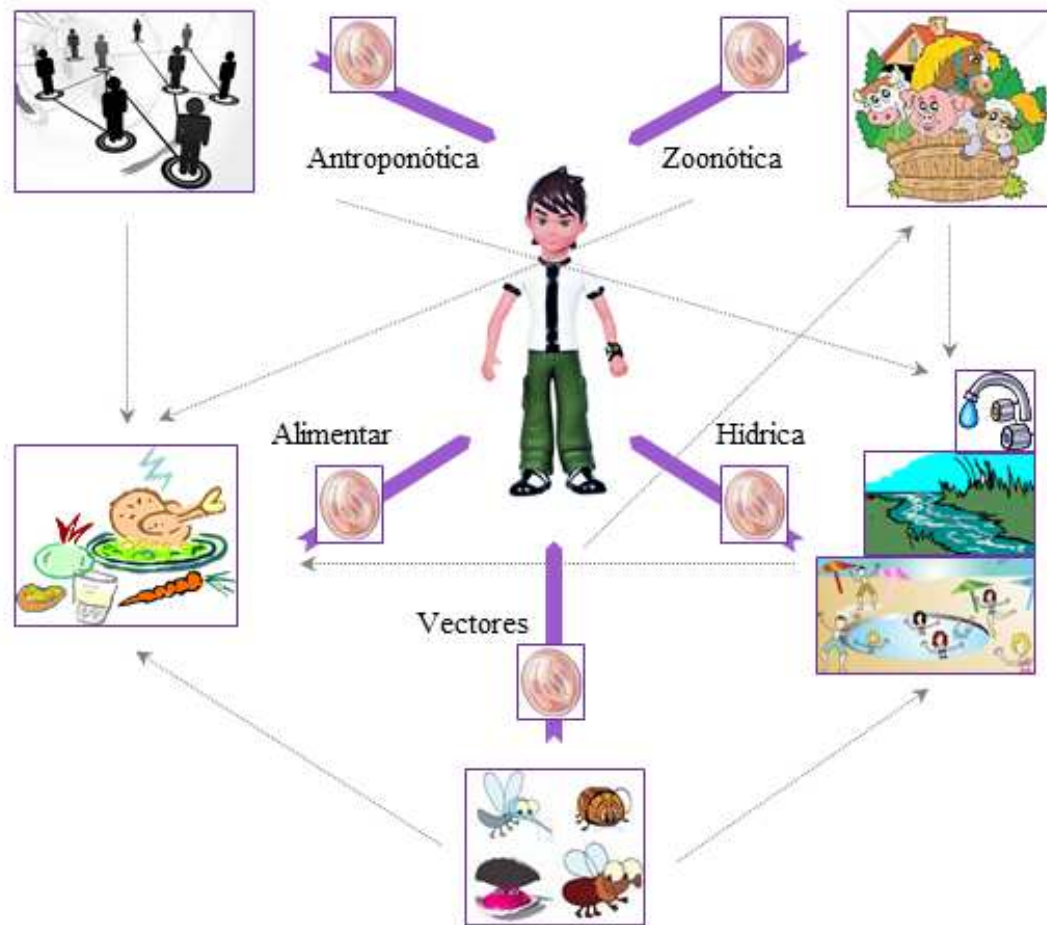


FIGURA 5. Transmissão da criptosporidiose humana. Representação esquemática das diferentes formas de transmissão da criptosporidiose ao Homem: antroponótica, zoonótica, alimentar, hídrica, e por intermédio de vectores.

QUADRO II. Determinantes epidemiológicos dos oocistos de *Cryptosporidium*. Principais características do parasita, relevantes para a sua epidemiologia e dinâmica de transmissão, e respectiva importância epidemiológica [Adaptado de Dillingham *et al.* (2002)].

CARACTERÍSTICA	IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
Elevada resistência ao cloro e aos ácidos	Fácil disseminação em águas recreativas e de consumo público submetidas a tratamentos de desinfecção, e em alimentos ácidos
Dimensão relativamente reduzida	Dificuldade no processo de filtração/retenção dos oocistos; necessidade de procedimentos específicos de tratamento das águas
Dose infecciosa reduzida	Conduz a elevadas taxas de infecção
Excretados na forma infecciosa	Facilita a transmissão por contacto directo humano-humano (transmissão antroponótica)
Potencial zoonótico	Animais constituem verdadeiros reservatórios, responsáveis pela disseminação dos oocistos em águas, alimentos e ambiente

1.4.3.1. TRANSMISSÃO ANTROPONÓTICA

Peng *et al.* (1997) clarificaram a existência de dois ciclos de transmissão distintos de *C. parvum* em humanos, tendo constatado que o genótipo 1 (actualmente denominado *C. hominis*) foi observado unicamente em humanos e não era infeccioso para outros animais; e o genótipo 2 de *C. parvum*, infeccioso para humanos e bovinos, também infectava outros animais. Estes dados foram sugestivos de um ciclo de transmissão antroponótico para além do já conhecido ciclo zoonótico.

A transmissão antroponótica é actualmente reconhecida como uma importante forma de transmissão de *Cryptosporidium* e, sendo mais frequente em áreas urbanas, ocorre em ambiente doméstico, em hospitais ou creches, sendo que este parasita também é responsável pela diarreia do viajante (Hunter *et al.*, 2004). Ocorre por contacto directo pessoa-a-pessoa, por via fecal-oral, podendo também ocorrer por via sexual, embora menos frequente. O contacto com pessoas que contraíram a infecção através de animais parasitados ou por ingestão de água e alimentos contaminados constitui, outra forma de transmissão antroponótica (Current & Garcia, 1991).

A transmissão pessoa-a-pessoa em ambiente doméstico tem sido largamente documentada e atinge, principalmente, crianças com idade inferior a cinco anos (Hunter

et al., 2004), particularmente, se estas residirem em zonas degradadas com grande densidade populacional (Newman *et al.*, 1999). Estudos efectuados no Bangladesh (Alam *et al.*, 1989) e no Quénia (Gatei *et al.*, 2006) concluíram que a criptosporidiose tem importantes implicações em saúde pública, e que a implementação de medidas de higiene pessoal reduziria substancialmente a transmissão da doença pessoa-a-pessoa, particularmente, quando existem animais domésticos como fonte primária de infecção. Pandak *et al.* (2006) descreveram, ainda, o caso de uma família que foi infectada por transmissão antroponótica de *Cryptosporidium* sp., de um outro familiar que estava infectado e ao qual prestaram cuidados de saúde. Outro dos modos de transmissão directa pessoa-a-pessoa, são os surtos de criptosporidiose em crianças que usam fraldas e nas pessoas que cuidam delas, quer em creches quer em ambiente doméstico. Um pouco por todo o mundo, inclusive em Portugal, encontram-se descritos casos desta natureza (Centers for Disease Control and Prevention, 1984; Melo Cristino *et al.*, 1988; Tangermann *et al.*, 1991).

A transmissão antroponótica também sucede com bastante frequência em ambiente hospitalar, nomeadamente entre doentes e técnicos de saúde, ou no caso de uma infecção nosocomial (Koch *et al.*, 1985; Dryjanski *et al.*, 1986; Feng *et al.*, 2012).

Vários estudos têm sugerido que o comportamento sexual, principalmente homossexual entre indivíduos do sexo masculino infectados por VIH, é um factor de risco que se tem mostrado significativamente associado à transmissão da criptosporidiose por contacto sexual (Lopez-Velez *et al.*, 1995; Matos *et al.*, 1998; Hellard *et al.*, 2003). Recentemente, Johnson *et al.* (2008b) publicaram um artigo de revisão que compila informação relativa a diversos estudos realizados neste contexto, tendo concluído que continua a ser de extrema importância clarificar estratégias comportamentais, nomeadamente no que se refere à redução da prática de sexo anal desprotegido e ao número de parceiros sexuais, assim como aumentar o apoio psicológico e logístico a este grupo particular.

1.4.3.2. TRANSMISSÃO ZOONÓTICA

A transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* ao Homem resulta do contacto directo com animais infectados, tendo sido pela primeira vez descrita em 1983 (Current *et al.*, 1983). O gado bovino, principalmente vitelos, tem sido considerado o principal reservatório de *C. parvum*, a espécie zoonótica mais frequente na criptosporidiose humana (Santin *et al.*, 2004; Hunter & Thompson, 2005; Xiao & Fayer, 2008; Santin *et al.*, 2008; Xiao, 2010). A excreção de oocistos por vitelos recém-nascidos infectados é muito elevada, entre 10^6 a 10^7 oocistos por grama de fezes (de Graaf *et al.*, 1999), tornando-os responsáveis pelo grande número de oocistos que contaminam o ambiente (Fayer *et al.*, 2000). Neste contexto, o gado tem estado particularmente associado a pequenos surtos de criptosporidiose entre estudantes de veterinária e tratadores de animais, após contacto com animais infectados (Preiser *et al.*, 2003; Gait *et al.*, 2008).

No Minnesota, EUA, a infecção por *Cryptosporidium* foi uma das causas de enterite em crianças, após frequentarem acampamentos agrícolas (Smith *et al.*, 2004; Kiang *et al.*, 2006). No Reino Unido, têm sido descritos vários surtos de criptosporidiose, após visitas de lazer a quintas e explorações leiteiras, cuja transmissão zoonótica ocorreu na sequência de contacto com gado infectado (Ribeiro & Palmer, 1986; Evans & Gardner, 1996).

A importância dos animais de companhia, particularmente cães e gatos, na transmissão zoonótica da criptosporidiose, não é muito clara. No entanto, o desenvolvimento das técnicas moleculares tem permitido aumentar o conhecimento acerca do potencial zoonótico deste protozoário (Hunter & Thompson, 2005; Xiao & Feng, 2008), principalmente em relação às espécies bem adaptadas ao cão e gato, respectivamente, *C. canis* e *C. felis* (Caccio *et al.*, 2005; Xiao & Fayer, 2008). Ambas as espécies, embora ocasionalmente descritas em imunocomprometidos (Xiao *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2001a; Alves *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2004; Cama *et al.*, 2007), não parecem constituir uma importante fonte de infecção, porque a presença de oocistos nas fezes de um animal não é prova de infecção do respectivo dono, pois ambos podem ter sido expostos à mesma fonte de infecção, assim como, o facto de o animal poder ter sido infectado pelo dono (Caccio *et al.*, 2005; Xiao & Feng, 2008; Lucio-Forster *et al.*, 2010). No entanto, a adopção de cuidados básicos de higiene constitui a medida preventiva essencial a uma eventual infecção, principalmente em indivíduos

imunocomprometidos (Glaser *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2004; Lucio-Forster *et al.*, 2010).

1.4.3.3. TRANSMISSÃO ALIMENTAR

Os surtos de criptosporidiose de origem alimentar têm sido associados ao consumo de alimentos contaminados, particularmente, frutas, leite não pasteurizado, vegetais e marisco, por intermédio de água contaminada com fezes humanas e animais (Fayer *et al.*, 2004). Esta associação resulta do facto dos alimentos serem consumidos crus, sem que lhes seja aplicado previamente qualquer processo térmico de inactivação dos oocistos. Por vezes, torna-se difícil estabelecer uma ligação concreta entre o consumo de determinado alimento e a infecção, devido ao facto da criptosporidiose poder ter um período de incubação alargado (entre quatro a 10 dias) (Dawson, 2005).

O primeiro surto de criptosporidiose associado ao consumo de alimentos contaminados aconteceu em 1993, nos EUA, em que foram identificados 160 casos de infecção entre vários participantes de uma feira agrícola. A ingestão de cidra obtida a partir de maçãs contaminadas, colhidas em zonas onde existiam fezes de bovinos, esteve na origem do surto. Neste estudo, detectou-se ainda que, os casos de transmissão alimentar estavam na origem de 53 casos secundários, de transmissão antroponótica (Millard *et al.*, 1994).

Diversos casos associados à transmissão da criptosporidiose através de leite não pasteurizado foram, também, descritos um pouco por todo o mundo, nomeadamente Austrália, EUA e Reino Unido (Elsser *et al.*, 1986; Gelletlie *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 2002).

Em 1995, foi diagnosticada criptosporidiose em 50 participantes de um evento social, após o consumo de salada de frango. A explicação mais provável relativa à origem da infecção relaciona-se com o facto de a salada ter sido preparada por um colaborador, que também trabalhava numa creche, onde havia mudado as fraldas a uma criança (Centers for Disease Control and Prevention, 1996). Foi descrito um surto de criptosporidiose semelhante, no qual um colaborador de uma cafetaria, que estava com diarreia, preparou frutas e vegetais destinados a serem consumidos crus (Quiroz *et al.*, 2000).

No Perú e na Costa Rica, foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* sp. em diversos vegetais como alface, hortelã, coentro, pepino, rabanete, cenoura, salsa e feijão mungo, disponíveis para venda em vários mercados locais (Ortega *et al.*, 1997; Calvo *et al.*, 2004). Num estudo recentemente efectuado em Valência, Espanha, foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* em alface e repolho chinês, tendo-se apurado que a fonte de infecção teria sido a água de rega das culturas (Amoros *et al.*, 2010).

A transmissão da criptosporidiose tendo como fonte bivalves (ameijoas, ostras, berbigão e mexilhão), tornou-se motivo de grande preocupação, dado o elevado número de surtos descritos por vários autores em diversos países como Irlanda, Inglaterra, Espanha e Itália. Os bivalves possuem a capacidade de filtrar grandes volumes de água, pelo que quando em água contaminada, retêm um elevado número de oocistos viáveis nas suas guelras e tracto gastrointestinal. O grande problema prende-se com o facto deste marisco ser, frequentemente, comido cru ou submetido a cozedura durante um curto período de tempo, aumentando, desta forma, o risco de transmissão do parasita ao Homem (Fayer *et al.*, 2003; Robertson, 2007). Estes estudos demonstraram claramente que a presença de oocistos no marisco resultou da exposição às fezes humanas e animais, em estuários e regiões costeiras, servindo também como indicador do grau de contaminação/qualidade dessas águas (Gomez-Bautista *et al.*, 2000; Freire-Santos *et al.*, 2000; Lowery *et al.*, 2001; Gomez-Couso *et al.*, 2003; Graczyk *et al.*, 2004). Em diversos estados da costa atlântica dos EUA, foram identificadas ameijoas, ostras e mexilhões contaminados com oocistos de *C. parvum* e *C. meleagridis*, indicativos de poluição a partir de fezes humanas e animais (Graczyk *et al.*, 1999a; Fayer *et al.*, 2003). Estudos feitos com várias espécies de bivalves, recolhidos aleatoriamente em vários locais da costa Portuguesa, revelaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nestas espécies marinhas, o que levou os autores a concluir que estes moluscos são importantes indicadores de contaminação das águas (Gomez-Couso *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2006). Estimativas preliminares sugerem que, anualmente possam ocorrer até seis milhões de casos de transmissão de *Cryptosporidium* por via alimentar na região leste do mediterrâneo, e até 27 milhões na região africana (Thompson & Smith, 2011).

1.4.3.4. TRANSMISSÃO HÍDRICA

A ingestão de água contaminada com oocistos viáveis de protozoários do género *Cryptosporidium*, proveniente de reservatórios e cursos de água, está na origem da transmissão hídrica de criptosporidiose (Madore *et al.*, 1987). Também em piscinas, águas paradas (lagos), e zonas onde são desenvolvidas actividades recreativas (piscinas, parques aquáticos), foram descritos vários surtos (Centers for Disease Control and Prevention, 1994; Centers for Disease Control and Prevention, 1998).

O primeiro surto de criptosporidiose ocorreu no Texas, em 1984, na rede pública de abastecimento de água (D'Antonio *et al.*, 1985). Contudo, foi com o surto de Milwaukee, em 1993, no qual foram infectadas aproximadamente 403.000 pessoas e morreram cerca de 100, devido ao consumo de água potável contaminada, que se abriu caminho para a realização de procedimentos concretos ao nível da detecção e controlo de microrganismos nas redes de água (Mac Kenzie *et al.*, 1994).

Entre 1984 e 1996, foram documentados na Europa, Japão, Canadá e EUA, um total de 32 surtos de criptosporidiose em água potável (Smith & Rose, 1998). Na maioria destes casos, os investigadores identificaram as falhas nas estações de tratamento de águas residuais e a ocorrência de fortes chuvadas, como sendo os principais responsáveis pelo aumento do número de parasitas na água superficial e nos reservatórios de água para abastecimento público (Rose *et al.*, 2002).

Nos EUA, no período compreendido entre 1988 e 2004, *Cryptosporidium* foi identificado como sendo o principal agente etiológico responsável por 5,5% (12/219) dos surtos de gastroenterite associados ao consumo de água potável. Também nestes surtos, os autores verificaram que o pico de doença ocorreu entre o início do Verão até ao início do Outono (Hlavsa *et al.*, 2005; Yoder & Beach, 2007).

Na Europa, tem sido mais escasso o número de surtos de criptosporidiose relacionados com águas de superfície ou abastecimento. Em Inglaterra, em 1992, registou-se um dos primeiros surtos de criptosporidiose, devido à contaminação na rede pública de abastecimento de água. Concluiu-se que a elevada precipitação devido à época do ano, Dezembro, possa ter conduzido ao arrastamento de oocistos de *Cryptosporidium* e desta forma, ter contaminado a rede pública de água (Atherton *et al.*, 1995). Em Itália, em 1995, ocorreu um surto de criptosporidiose devido à contaminação de um reservatório de água alimentado a partir da rede pública de abastecimento de

água, numa comunidade de reabilitação de toxicodependentes, com elevado impacto na saúde dos indivíduos, pois a grande maioria deles apresentava imunossupressão severa induzida por VIH (Pozio *et al.*, 1997). Na Irlanda, entre 2000 e 2001, registaram-se três surtos de criptosporidiose com origem na rede de água de abastecimento público, cuja causa de contaminação foi uma infiltração de águas residuais nos sistemas de distribuição de água potável (Glaberman *et al.*, 2002). Em 2007, ocorreu um novo surto de criptosporidiose, com origem na água de abastecimento público e na água proveniente de um importante lago irlandês (Pelly *et al.*, 2007). Mais recentemente, na Escócia, foi documentada a associação entre um surto de criptosporidiose e o consumo de água proveniente de um lago, cujo facto de a água não ser sujeita a filtração ou qualquer outro processo de tratamento, foi considerado um significativo factor de risco (Pollock *et al.*, 2008). Em Portugal, em 2009, foi publicado um estudo com os resultados da monitorização da presença de *Cryptosporidium* em águas tratadas e não tratadas, provenientes de fontes superficiais e do solo. Foram identificadas as espécies de *C. andersoni*, *C. muris*, *C. hominis* e *C. parvum*, e à semelhança do que aconteceu noutros países, os autores deste estudo também concluíram que, qualquer que seja a fonte da água para consumo, esta continua a constituir um potencial veículo para a transmissão da criptosporidiose. Concluíram ainda, pela importância de se manterem apertadas as estratégias preventivas e de controlo das águas (Lobo *et al.*, 2009).

Durante os últimos vinte anos, nos EUA, Canadá, Reino Unido, Nova Zelândia e Austrália, a contaminação de águas de recreio, nomeadamente piscinas públicas e lagos, com oocistos de *Cryptosporidium* spp., tem sido responsável pela transmissão da criptosporidiose a mais de 10.000 pessoas. Nos EUA, entre 1988 e 2004, *Cryptosporidium* foi identificado como sendo o agente causal de 33% (63/189) dos surtos de gastroenterite associados à contaminação de águas de recreio (Hlavsa *et al.*, 2005; Yoder & Beach, 2007). Mundialmente, entre 2004 e 2010, foram documentados, aproximadamente, 199 surtos de origem hídrica, em que *Cryptosporidium* spp. foi o agente etiológico predominante em cerca de 60,3% (120/199) dos surtos. Verificou-se que as fontes de infecção foram águas de recreio contaminadas, principalmente por *Cryptosporidium* spp. em 32,7% (65/199) dos casos (Baldursson & Karanis, 2011). Em 2009, na Austrália, deu-se o maior surto de criptosporidiose até então documentado neste país, no qual 1141 pessoas foram infectadas com *Cryptosporidium* spp. após

frequentarem piscinas públicas. Verificou-se, ainda, que crianças até aos quatro anos de idade foram a faixa etária mais susceptível (Waldron *et al.*, 2011). Nas piscinas públicas, a associação de diversos factores como a grande percentagem de utilização das mesmas, a elevada resistência dos oocistos à cloração, e os acidentes fecais provocados por crianças com fraldas ou por indivíduos incontinentes, facilitam a transmissão da doença (Centers for Disease Control and Prevention, 2003; Yoder & Beach, 2007; Baldursson & Karanis, 2011).

Com a melhoria das estratégias de tratamento das águas e dos sistemas de vigilância, tem-se assistido a uma redução significativa no número de surtos, principalmente nos países industrializados. Contudo, esta melhoria provoca uma distorção no reflexo do padrão de distribuição global de criptosporidiose, pois assiste-se a uma maior prevalência desta parasitose nos países em desenvolvimento, devido aos baixos níveis de higiene. Nestes países, a transmissão hídrica de *Cryptosporidium* deve ser também estimada com o máximo de veracidade, para que se possa ter uma noção mais real da prevalência deste parasita.

1.4.3.5. TRANSMISSÃO MECÂNICA POR VECTORES

Os insectos também podem servir como vectores mecânicos no transporte de oocistos de *Cryptosporidium*, cuja propagação no ambiente é assim facilitada. Neste contexto, o seu papel tem sido menos frequentemente descrito, mas é considerado igualmente importante (Xiao, 2009). Baratas, moscas, besouros e escaravelhos têm sido sugeridos como os vectores mais frequentemente implicados na disseminação mecânica dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Graczyk *et al.*, 1999b; Dillingham *et al.*, 2002; Conn *et al.*, 2007).

1.4.4. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA CRIPTOSPORIDIOSE

As técnicas de biologia molecular têm-se tornado cada vez mais importantes no contexto da epidemiologia das doenças infecciosas. Actualmente, a epidemiologia molecular é considerada um ramo da epidemiologia, cuja utilização de técnicas de biologia molecular para o estudo da distribuição e dos determinantes de ocorrência da

doença nas populações (epidemiologia), permite a caracterização dos agentes, da ecologia e da dinâmica de transmissão das doenças (Foxman & Riley, 2001). Antes da utilização destas técnicas, a caracterização de *Cryptosporidium* era efectuada com base na observação microscópica da morfologia dos oocistos, na constatação do hospedeiro no qual o parasita era encontrado e nos resultados dos estudos de infecção experimental. Os dados obtidos destas observações permitiram identificar diversas espécies de *Cryptosporidium*, o que gerou, contudo, enormes controvérsias taxonómicas (O'Donoghue, 1995). Nos últimos anos, os métodos moleculares têm sofrido grande desenvolvimento, e têm sido aplicados na detecção, genotipagem, subgenotipagem, caracterização da transmissão de *Cryptosporidium* em humanos e animais, para além de conduzirem a um maior reconhecimento da importância para a saúde pública das diversas espécies/genótipos do parasita e das várias fontes de infecção (Xiao, 2010).

Os primeiros estudos acerca da diversidade entre estes parasitas centraram-se na variabilidade fenotípica encontrada entre isolados de *C. parvum* de humanos e de gado doméstico (bovino, caprino e ovino). A técnica de “Western blotting”, baseada na utilização de anticorpos monoclonais e policlonais, permitiu estudar a referida variabilidade, após análise da composição antigénica dos isolados de oocistos (Nichols *et al.*, 1991; Griffin *et al.*, 1992; Nina *et al.*, 1992). Através da caracterização isoenzimática associada ao género *Cryptosporidium* (Ogunkolade *et al.*, 1993; El-Ghaysh & Barrett, 1999), observou-se um dimorfismo entre os isolados de origem humana e os de origem animal. Contudo, a principal desvantagem desta técnica era a necessidade de um elevado número de oocistos, muito difícil de obter na maioria das vezes. O problema da escassez de oocistos obtidos a partir das amostras biológicas foi ultrapassado com a emergência das técnicas baseadas na reacção em cadeia da polimerase ou PCR (do inglês “polymerase chain reaction”), possibilitando assim, o estudo da epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 2000). Com o advento desta técnica, e associado ao facto do parasita possuir um genoma relativamente pequeno, composto por oito cromossomas e com tamanho total aproximado de 10,4 megabases (Abrahamsen, 2001), os investigadores esperam poder responder a inúmeras questões relevantes como: i) a definição dos parasitas capazes de causar infecção humana, principalmente associada à transmissão zoonótica; ii) a frequência de infecções mistas; iii) a manutenção da imunidade e da protecção na

transmissão cruzada; iv) a caracterização da dinâmica de transmissão da infecção em diferentes populações e contextos; v) a importância, para a saúde pública, da presença de oocistos nas águas de consumo e de recreio; vi) a patogenicidade e virulência apresentadas pelas diferentes espécies/genótipos que provocam doença humana; vii) e a definição da estrutura populacional e da taxonomia deste género (Xiao, 2010).

As diferenças entre os isolados de *C. parvum* de origem humana e bovina foram analisadas por Morgan *et al.* (1995), através da técnica de amplificação de polimorfismos de ácido desoxirribonucleico ou DNA (do inglês “deoxyribonucleic acid”) de distribuição aleatória ou RAPD (do inglês “random amplified polymorphic DNA”). Segundo os autores, os referidos isolados dividiam-se em dois grupos principais, um contendo a maioria dos isolados humanos e outro englobando todos os isolados bovinos e os restantes isolados humanos. Seguiram-se outras investigações semelhantes, nas quais foram aplicadas as técnicas de PCR, RAPD, polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP (do inglês “restriction fragment length polymorphism”) e sequenciação, à caracterização genética de isolados de *C. parvum* de humanos e de outros animais, principalmente bovinos (Carraway *et al.*, 1996; Deng & Cliver, 1998; Shianna *et al.*, 1998). A análise genética incidiu sobre diversos genes, nomeadamente, a SSU rRNA (Xiao *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2001b; Xiao *et al.*, 2004b), a proteína de choque térmico de 70 kDa ou HSP70 (do inglês “heat shock protein”) (Sulaiman *et al.*, 2000; Gobet & Toze, 2001), a glicoproteína de 60 kDa ou gp60 (Glaberman *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003), os genes que codificam a proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* ou COWP (do inglês “*Cryptosporidium* oocyst wall protein”) (Patel *et al.*, 1998; McLauchlin *et al.*, 1999), a proteína de adesão relacionada com a trombospondina de *Cryptosporidium*-1 ou TRAP-C1 (do inglês “thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium* 1”) (Spano *et al.*, 1998; McLauchlin *et al.*, 1999), a proteína de adesão relacionada com a trombospondina de *Cryptosporidium*-2 ou TRAP-C2 (do inglês “thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium* 2”) (Peng *et al.*, 1997), o gene da β -tubulina (Widmer *et al.*, 1998; Caccio *et al.*, 1999), o gene da dihidrofolato reductase ou DHFR (do inglês “dihydrofolate reductase”) (Gibbons *et al.*, 1998), as regiões dos espaçadores internos transcritos ou ITS (do inglês “internal transcribed spacers”) do rDNA (Morgan *et al.*, 1999), a análise de micro e minissatélites (Caccio *et al.*, 2000;

Tanriverdi & Widmer, 2006), a actina (Sulaiman *et al.*, 2002) e algumas regiões genómicas não codificantes (Bonnin *et al.*, 1996; Leoni *et al.*, 2006). Todos estes estudos resultaram num importante ponto comum, que foi a confirmação da existência de dois genótipos distintos de *C. parvum*, o genótipo humano e o genótipo bovino, amplamente conservados, com diferentes especificidades de hospedeiro e envolvidos em diferentes ciclos de transmissão. Deste modo, o genótipo humano, encontrado em isolados de origem humana, estava envolvido num ciclo de transmissão antroponótico, ocorrendo exclusivamente entre humanos; e o genótipo bovino, presente em isolados de origem humana e de gado doméstico, encontrava-se envolvido na transmissão zoonótica (Peng *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1998).

Adicionalmente aos estudos acima referidos seguiram-se inúmeras investigações, com principal interesse no alinhamento e na análise filogenética, relativos a cada gene, das sequências nucleotídicas obtidas para os diversos isolados caracterizados. A evidência de sequências únicas, que ostentavam diferenças significativas entre si, mostrou que *C. parvum* é uma espécie constituída por vários genótipos distintos, aos quais foi dado o nome do hospedeiro no qual os isolados foram identificados. Deste modo, para além dos dois genótipos acima referidos, foram identificados muitos outros, adaptados ao respectivo hospedeiro, assim como evidência adicional da validade das restantes espécies de *Cryptosporidium* descritas anteriormente, nomeadamente *C. meleagridis*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. baileyi*, *C. saurophilum*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. molnari*, *C. serpentis*, *C. bovis*, *C. scophithalmi*, *C. suis* e *C. galli* (Tyzzer, 1907; Tyzzer, 1912; Slavin, 1955; Vetterling *et al.*, 1971; Iseki, 1979; Levine, 1980; Current *et al.*, 1986; Koudela & Modrý, 1998; Pavlasek, 1999; Lindsay *et al.*, 2000; Fayer *et al.*, 2001; Morgan-Ryan *et al.*, 2002; Alvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla, 2002; Ryan *et al.*, 2004; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2005).

O polimorfismo genético entre as espécies de *Cryptosporidium* está a ser detectado a uma velocidade continuamente crescente, no entanto, nem todas as espécies apresentam o mesmo grau de divergência genética entre si. A ampla utilização das técnicas moleculares, fundamentais para a caracterização biológica detalhada, tem permitido avaliar a extensão dessa divergência, ao ponto de sugerir que determinado genótipo possa constituir uma espécie diferenciada. A extensão da diversidade genética

encontrada entre os diferentes genótipos, associada à incerteza da classificação taxonómica, preconizou que a designação *C. parvum* seria unicamente utilizada para designar os isolados infectados pelo genótipo bovino. Por outro lado, Peng *et al.* (1997) descreveram dois ciclos de transmissão distintos de *C. parvum*, tendo ainda verificado que o genótipo humano de *C. parvum* não era infectante para bovinos e roedores. Estudos subsequentes mostraram diferenças significativas ao nível da patogenicidade induzida pelos dois genótipos, humano e bovino. Para além disso, verificou-se que os dois genótipos de *C. parvum* se encontravam geneticamente distantes, pelo que Morgan-Ryan *et al.* (2002) descreveram o genótipo humano de *C. parvum* como uma espécie distinta, que denominaram de *C. hominis*. Por sua vez, os isolados infectados pelos restantes genótipos seriam identificados com o nome do género, seguido do nome do hospedeiro no qual foram encontrados (Xiao *et al.*, 2002; Plutzer & Karanis, 2009). Na sequência da utilização destas técnicas, conseguiu-se efectuar a caracterização de isolados morfológicamente indistinguíveis, que estavam na origem da infecção humana e hoje sabe-se, que as espécies *C. parvum* e *C. hominis* são as principais responsáveis pela maior parte das infecções no Homem (Morgan *et al.*, 1995; Bonnin *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 1998; Spano *et al.*, 1998; Caccio *et al.*, 1999; McLauchlin *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2001b; Alves *et al.*, 2003).

Apesar de inúmeras questões ainda permanecerem sem resposta, os estudos de epidemiologia molecular da criptosporidiose têm possibilitado a compreensão da genética dos microorganismos que constituem o género *Cryptosporidium*, das fontes da infecção humana, do impacto destes parasitas em saúde pública, da existência de vários ciclos de transmissão distintos no homem, e têm desempenhado, igualmente, um papel importante na caracterização da dinâmica da transmissão em áreas endémicas e epidémicas (Xiao & Ryan, 2004; Thompson & Smith, 2011).

1.5. ASPECTOS CLÍNICOS DA CRIPTOSPORIDIOSE HUMANA

A criptosporidiose é uma das infecções entéricas mais comuns nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, a característica clínica mais evidente desta patologia é a diarreia, cujos principais responsáveis são parasitas do género *Cryptosporidium*. Apenas 10 oocistos podem ser suficientes para causar infecção num indivíduo imunocompetente, de forma assintomática ou sintomática, e apresentando neste último caso, evolução aguda e autolimitada acompanhada de diversas manifestações gastroenterológicas (Okhuysen *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002). O período de incubação da doença pode variar entre três a sete dias, dependendo de uma combinação de factores do hospedeiro e do parasita (Tzipori & Ward, 2002). Normalmente, a diarreia é profusa e aquosa, podendo conter muco, mas raramente sangue e leucócitos, e está muitas vezes associada a perda de peso. Outros sintomas menos comuns incluem dor abdominal, náuseas, vômitos e febre baixa. Ocasionalmente podem surgir mialgias, astenia, mal-estar, cefaleias e anorexia. A sintomatologia dura entre três a 14 dias, embora possa ocorrer, ocasionalmente, durante mais alguns dias (Leav *et al.*, 2003). A duração e gravidade desses sintomas dependem de diversos factores, sendo o mais importante o estado imunológico do hospedeiro (Current & Garcia, 1991).

Num estudo efectuado em voluntários saudáveis, observou-se que o número de oocistos excretados por indivíduos com diarreia foi cerca de 50 vezes superior ao eliminado por portadores assintomáticos ou com sintomas menos severos. Observou-se ainda que, durante a fase de diarreia e após a infecção, a eliminação de oocistos nas fezes foi, com frequência, intermitente. Os autores concluíram que o período de excreção dos oocistos coincide com a fase de diarreia, podendo prolongar-se por duas ou três semanas após o desaparecimento da sintomatologia gastrointestinal (Chappell *et al.*, 1996).

A criptosporidiose em doentes imunocomprometidos, nomeadamente com sida, sujeitos a quimioterapia, transplantados e com alterações hematológicas, produz um quadro clínico com algumas diferenças relativamente à população imunocompetente, no que se refere à gravidade e cronicidade da diarreia, assim como à localização extra-intestinal da infecção (Gentile *et al.*, 1991; Hunter & Nichols, 2002; Chalmers & Davies, 2010). Em indivíduos coinfectados por VIH e *Cryptosporidium*, o espectro da

doença correlaciona-se com a contagem dos linfócitos T CD4⁺, podendo apresentar várias manifestações:

a) doença fulminante, em indivíduos com contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 50 células/mm³. A perda de líquidos nas fezes é superior a dois litros por dia, conduzindo a alterações do equilíbrio hidro-electrolítico, desidratação grave, caquexia e, eventualmente, morte (Flanigan *et al.*, 1992; Blanshard *et al.*, 1992; Colford *et al.*, 1996);

b) doença crónica, em indivíduos com contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 140 células/mm³. Diarreia aquosa profusa, com duração superior a dois meses, em simultâneo com acentuada perda de peso, desidratação e má absorção, constituem as manifestações mais evidentes (Flanigan *et al.*, 1992; Blanshard *et al.*, 1992; Colford *et al.*, 1996);

c) doença autolimitada, em indivíduos com contagem de linfócitos T CD4⁺ superior a 180 células/mm³. A manifestação mais evidente é uma diarreia aquosa profusa, de duração inferior a dois meses, seguida de completa remissão dos sintomas e interrupção da excreção de oocistos (Flanigan *et al.*, 1992; Blanshard *et al.*, 1992; Colford *et al.*, 1996);

d) doença caracterizada por acentuada perda de peso, febre e dores abdominais, sem diarreia. Ocorre em indivíduos com contagem de linfócitos T CD4⁺ superior a 400 células/mm³ (valor de referência) e, na maioria das situações, a identificação do parasita nas fezes ou por biópsia intestinal ocorre por acaso (Blanshard *et al.*, 1992).

Nos EUA, realizou-se um estudo, com duração de 10 anos, em que se verificou que, de entre 16.953 pessoas infectadas por VIH, cerca de 3,8% tinham criptosporidiose (Sorvillo *et al.*, 1994). Num estudo multicêntrico efectuado entre vários países da Europa, os dados mostram que a criptosporidiose parece afectar cerca de 6,6% dos indivíduos coinfectados por VIH (Pedersen *et al.*, 1996). Em Portugal, após um estudo efectuado em 465 pessoas infectadas por VIH com diarreia, Matos *et al.* (1998) mostraram que o valor de prevalência da criptosporidiose era de 8%.

Nas crianças, a criptosporidiose constitui uma das principais causas de diarreia, particularmente nos países em desenvolvimento nos quais a doença é endémica (Newman *et al.*, 1994), surgindo com maior frequência em idade inferior a dois anos (Chalmers & Davies, 2010). Um estudo efectuado no Bangladesh corrobora bem esta

diferenciação, em que 96% (44/46) das crianças com infecção por *Cryptosporidium* tinham idade inferior a dois anos (Khan *et al.*, 2004). Nos países industrializados, a maioria dos casos são detectados em crianças com idade inferior a cinco anos, mais tardiamente do que nos países em desenvolvimento, presumivelmente devido às melhores condições de higiene existentes (Sulaiman *et al.*, 2005). Investigadores italianos estudaram as particularidades da infecção por *Cryptosporidium* em crianças infectadas por VIH. Concluíram que, nas crianças que tinham coinfecção pelos dois microrganismos, a duração da sintomatologia, nomeadamente de diarreia, foi mais prolongada do que nas crianças que apresentavam diarreia por outras causas (Guarino *et al.*, 1997).

Para além de desenvolverem formas graves de doença gastrointestinal típica, os infectados por VIH podem desenvolver apresentações atípicas da doença, em locais do organismo que normalmente não são afectados nos imunocompetentes. Estas localizações extra-intestinais podem ser ao nível do estômago, sistema biliar, pâncreas ou aparelho respiratório (Hunter & Nichols, 2002). O envolvimento gástrico é, provavelmente, mais comum do que o que está descrito, mas a detecção do parasita apresenta um grau de dificuldade acrescido devido à frequente ausência de sintomatologia e, depende da realização de endoscopia gástrica com biópsia. Uma das complicações mais problemáticas ao nível do estômago relaciona-se com a ocorrência de estenose do antro, condicionando o esvaziamento gástrico e absorção de nutrientes (Garone *et al.*, 1986; Cersosimo *et al.*, 1992). A criptosporidiose biliar é a forma mais comum de doença extra-intestinal, cujo número total de casos é ainda desconhecido, devido ao facto do diagnóstico depender do recurso a técnicas invasivas, que não são realizadas por rotina (Hunter & Nichols, 2002; Chen *et al.*, 2002). Após o surto de criptosporidiose em Milwaukee, em 1993, Vakil *et al.* (1996) verificaram que 88% dos doentes coinfectados por VIH e *Cryptosporidium* apresentavam manifestações clínicas de envolvimento das vias biliares, com contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 50 células/mm³. Godwin (1991) sugeriu, após um conjunto de autópsias efectuadas a doentes infectados, que a pancreatite também poderia estar associada à coinfecção por *Cryptosporidium* e VIH. A dificuldade em efectuar o diagnóstico ainda não permitiu confirmar esta evidência, pois até à data só se encontra descrito em análises *post-mortem* (Godwin, 1991). Diversos autores têm descrito a presença de oocistos de

Cryptosporidium em secreções respiratórias de doentes infectados por VIH, associada a sintomas como tosse, dispneia, febre e dor na região torácica. Num estudo realizado em Espanha, verificou-se que 16,28% dos doentes com sida e com diarreia crónica associada a *Cryptosporidium*, apresentavam oocistos deste parasita na expectoração (Lopez-Velez *et al.*, 1995). Contudo, diversos exames mostraram a coexistência de outros microrganismos no aparelho respiratório como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii* e citomegalovírus, o que dificultou o esclarecimento destas observações clínicas relativamente à criptosporidiose como causa de doença respiratória.

Doentes com neoplasias hematológicas e sob quimioterapia, transplantados de medula óssea e de órgãos sólidos, e doentes hemodialisados, constituem outro grupo particular, que pelo facto de também serem imunocomprometidos, são bastante susceptíveis à criptosporidiose (Gentile *et al.*, 1991; Tanyuksel *et al.*, 1995; Seyrafián *et al.*, 2006). Outras doenças que estão associadas a um maior risco de criptosporidiose grave, são as imunodeficiências primárias, que afectam linfócitos T e B, as imunodeficiências relacionadas com os anticorpos, as imunodeficiências do sistema complemento, e as alterações relacionadas com o número e função dos fagócitos (Hunter & Nichols, 2002).

Apesar de todo o envolvimento extra-intestinal que a criptosporidiose parece determinar, a fisiopatologia da diarreia associada à infecção por *Cryptosporidium* na célula epitelial parasitada é complexa. Os mecanismos exactos de diarreia neste contexto ainda não se encontram totalmente clarificados, todavia, esta parece ser principalmente uma consequência de (1) atrofia grave das vilosidades, que diminui a absorção, e de (2) alterações no transporte dos electrólitos, conduzindo à libertação de mediadores inflamatórios. A etiologia multifactorial dependente da interacção parasita-hospedeiro e da resposta imunitária gerada, são outros dois factores que promovem a complexidade da patologia (Chen *et al.*, 2002; Gookin *et al.*, 2002; Tzipori & Ward, 2002; Chalmers & Davies, 2010). A fixação do parasita ao nível da membrana plasmática apical dos enterócitos parece constituir o pré-requisito para as subsequentes sequelas da infecção, estando na origem de alterações estruturais e funcionais no epitélio intestinal (Laurent *et al.*, 1997; Gookin *et al.*, 2002; Tzipori & Ward, 2002). A principal ocorrência é a atrofia das vilosidades, com perda contínua do epitélio de

absorção (diminuição do número de enterócitos), de que resulta o encurtamento e fusão das vilosidades, assim como hiperplasia e alongamento das células das criptas. O surgimento de infiltrações de células na lâmina própria acompanha estes acontecimentos, que no seu conjunto determinam a ocorrência de fenómenos de má absorção de fluidos, electrólitos e nutrientes a partir do lúmen intestinal, conduzindo à perda de enzimas digestivas da membrana (Chen *et al.*, 2002; Tzipori & Ward, 2002). Alguns estudos descrevem que a natureza secretória da diarreia é induzida pela produção de prostaglandinas e citocinas, com capacidade para inibir a absorção de cloreto de sódio e induzir a secreção de iões cloreto e iões bicarbonato ao nível dos enterócitos (Argenzio *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2002). Outros estudos propõem a presença de enterotoxinas como causa da diarreia, mas até à data este facto ainda não foi conclusivamente demonstrado (Guarino *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002).

1.6. DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE

O diagnóstico diferencial da criptosporidiose deve ser considerado em qualquer doente que apresente diarreia aguda ou persistente, especialmente, se ocorrer simultaneamente numa pessoa com o sistema imunitário imunocomprometido. O principal problema reside no facto de a sintomatologia gastrointestinal inicial desta doença ser comum a outras patologias do mesmo foro, causadas por microrganismos como enterobactérias, vírus e outros parasitas. Desta forma, o diagnóstico definitivo requer sempre a identificação microscópica de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais. Dados clínicos, imunológicos, endoscópicos e técnicas moleculares também desempenham um importante papel no diagnóstico e avaliação clínica da criptosporidiose. Quando existe suspeita de criptosporidiose extra-intestinal, a pesquisa de oocistos é efectuada noutras amostras que não as fecais, como aspirado duodenal, biliar, lavado brocoalveolar e expectoração (Chen *et al.*, 2002).

1.6.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

O diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium*, no Homem e noutros animais, começou por ser efectuada por meio da observação histológica das formas de desenvolvimento intracelular, em material de autópsia ou em biópsias de tecido intestinal. Nestas amostras, a coloração de Giemsa e de hematoxilina-eosina constituíram os métodos histoquímicos mais utilizados (O'Donoghue, 1995).

O recurso à microscopia electrónica de transmissão permite a observação detalhada da ultra-estrutura do parasita, e respectiva localização no interior dos vacúolos parasitóforos, tal como a microscopia electrónica de varrimento pode ser usada para confirmação da infecção (O'Donoghue, 1995; Chen *et al.*, 2002). Contudo, estas técnicas são demasiado dispendiosas, morosas e apresentam baixa sensibilidade, porque apenas pequenas amostras de tecidos podem ser examinadas, para além de que a infecção não se distribui uniformemente por todos os tecidos, particularmente nas situações de carga parasitária reduzida (O'Donoghue, 1995; Chen *et al.*, 2002). Apesar da utilidade destas técnicas para investigar as alterações histológicas e citológicas que acompanham uma infecção por parasitas do género *Cryptosporidium*, não são utilizadas no diagnóstico de rotina (O'Donoghue, 1995; Chen *et al.*, 2002).

1.6.2. DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO

Actualmente, o diagnóstico da criptosporidiose é efectuado por observação microscópica do material fecal, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Em 1981, foi introduzida a coloração de Ziehl-Neelsen, como sendo a técnica de referência para o diagnóstico quantitativo da criptosporidiose (Henriksen & Pohlenz, 1981). Posteriormente foram introduzidas algumas modificações, mas de um modo geral, esta técnica permite a associação entre um método de colheita de produto biológico não invasivo, com outro de coloração diferencial de execução simples. Após a colheita das amostras fecais, os oocistos são concentrados e procede-se à coloração propriamente dita. À fixação na lâmina com metanol, sucede-se a coloração com fucsina básica fenolada, a qual é retida pelos oocistos após a descoloração pelo álcool-ácido. Esta particularidade permite diferenciar os oocistos do restante material fecal após coloração de contraste com verde-malaquite ou azul-de-metileno. A observação ao microscópio óptico, com ampliação de 200 ou 400 vezes, permite evidenciar os oocistos, que se apresentam como pequenas estruturas coradas de cor-de-rosa, de diâmetro compreendido entre 4 a 6 µm, contrastando com o restante material fecal cuja cor é dada pelo corante de contraste. Nalguns oocistos podem-se observar, internamente, esporozoítos e corpos residuais, que apresentam coloração mais escura, particularmente evidenciados se a observação for efectuada com a objectiva de imersão (ampliação de 1000 vezes) (Casemore *et al.*, 1985b).

A coloração diferencial dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. pode ser efectuada com recurso a outros métodos, nomeadamente, o método auramina-fenol/fucsina, o método de Kinyoun modificado ou a coloração com safranina e azul de metileno (Ma & Soave, 1983; Baxby *et al.*, 1984; Casemore *et al.*, 1985b; Fayer *et al.*, 2000). As estruturas evidenciadas por estes métodos de coloração devem ser cuidadosamente observadas, pelo facto de se conseguir fazer a distinção entre os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e estruturas semelhantes, como glóbulos de gordura e esporos bacterianos (Casemore, 1991). A obtenção de resultados falsos positivos pode ocorrer quando é utilizado excesso de corante na preparação (semelhança com células de leveduras), ou quando se efectuam observações a fresco, de preparações fecais para a identificação de oocistos (semelhança com leveduras e esporos de fungos) (Casemore, 1991).

Numa situação aguda de criptosporidiose, a excreção de oocistos é muito elevada pelo que, usualmente, não há necessidade de se recorrer a processos de concentração de oocistos. Contudo, a excreção de oocistos não é contínua durante todo o curso da infecção, pelo que a sua detecção por microscopia convencional poderá estar comprometida, nas situações de infecção ligeira ou nos casos assintomáticos. Neste sentido, torna-se necessário recorrer a técnicas de concentração de oocistos presentes nas amostras fecais (Casemore, 1991). Encontram-se descritos vários métodos, nomeadamente, flutuação por gradientes de sucrose e separação em colunas de vidro, separação por gradientes de Percoll, extracção com formol-éter, separação por gradientes de cério, entre outros (Waldman *et al.*, 1986; Heyman *et al.*, 1986; Weber *et al.*, 1992; Suresh & Rehg, 1996; Fayer *et al.*, 2000). Estes métodos incluem sempre um passo de remoção de gorduras e de detritos fecais, que podem interferir com a sua sensibilidade, de forma a evitar coloração ou fluorescência de fundo. Contudo, existem diferenças de sensibilidade entre os diferentes métodos, no que se refere ao processamento das amostras, podendo ocorrer perdas na recuperação dos oocistos, que resultam numa diminuição da sensibilidade do diagnóstico (Weber *et al.*, 1992; Fayer *et al.*, 2000). Apesar de terem grande utilidade para a detecção de oocistos, nenhum destes métodos permite a identificação da espécie de *Cryptosporidium* (Jex *et al.*, 2008).

1.6.3. DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Os métodos imunológicos surgiram nos últimos anos, aplicados principalmente à detecção de oocistos de *Cryptosporidium* por intermédio de anticorpos monoclonais, através de técnicas de imunofluorescência e imunoenzimáticas. Incluem reacções de aglutinação com látex (pesquisa de oocistos), imunofluorescência com anticorpos policlonais ou monoclonais (detecção de oocistos e antigénios), testes de ELISA (do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”) (detecção de oocistos e antigénios), hemaglutinação passiva reversa (detecção de antigénios) e testes imunocromatográficos (detecção de antigénios), apresentando estes ensaios algumas vantagens, no que se refere à detecção de oocistos e ao diagnóstico da criptosporidiose (Fayer *et al.*, 2000; Jex *et al.*, 2008). A principal limitação do uso dos testes imunológicos relaciona-se com

a probabilidade de ocorrência de reacções cruzadas com outros microrganismos, originando resultados falsos positivos (Fayer *et al.*, 2000).

As técnicas de imunofluorescência permitem identificar de forma fácil e rápida os oocistos nos esfregaços fecais, após a marcação com anticorpos monoclonais. Actualmente, existem diversos “kits” comercializados, para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais ou fecais, contudo, o seu elevado preço e a necessidade obrigatória de utilização de um microscópio de fluorescência para a leitura dos esfregaços, constituem desvantagens à utilização destas técnicas. Existe, ainda, alguma controvérsia relativamente à sensibilidade destas técnicas quando comparadas com a coloração diferencial, pois embora alguns autores reportem a imunofluorescência como sendo a técnica mais sensível, outros descrevem sensibilidades semelhantes entre ambas (Alles *et al.*, 1995; Fayer *et al.*, 2000).

Os testes imunoenzimáticos visam detectar antígenos de *Cryptosporidium* e, de um modo geral, permitem analisar simultaneamente um grande número de amostras. Contudo, apresentam sensibilidade inferior às técnicas de imunofluorescência, para além de terem alguns problemas de especificidade, pelo facto de que não permitirem a identificação morfológica dos parasitas (Casemore, 1991; Jex *et al.*, 2008).

1.6.4. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma tecnologia baseada em lasers, que são utilizados para analisar múltiplos parâmetros das células individuais dentro das populações heterogéneas, nomeadamente, no que se refere ao tamanho, lobularidade e granulosidade. A aplicabilidade desta tecnologia é muito variada e extensa, sendo usada para imunofenotipagem (imunofluorescência associada à marcação com anticorpos monoclonais), análise de ploidia, contagem de células, análise dos organelos celulares, estudos funcionais (potenciais de membrana, proliferação celular, medição do fluxo de cálcio), entre outras utilizações (Jaroszeski & Radcliff, 1999).

Esta tecnologia combina a dimensão da amostra, a velocidade de aquisição de dados, a precisão e a multiplicidade de medição, o que permite descrever o citómetro como um conjunto de quatro sistemas interligados: o sistema de fluidos (transporta as partículas a partir de uma amostra, através do instrumento, para a análise) (figura 6a), o

sistema de lasers (fonte de iluminação para a dispersão e emissão da fluorescência) (figura 6b), o sistema de óptica e detectores (recolhe e direcciona a luz) (figura 6c) e o sistema de armazenamento de dados e computador (converte os sinais provenientes dos detectores em dados digitais e executa a análise necessária) (figura 6d) (Picot *et al.*, 2012). Quando as células passam pela fonte de excitação, a dispersão da luz laser é efectuada em diversos ângulos, consoante o tipo de células que está a ser analisado. A dispersão da luz para a frente ou FSC (do inglês “forward angle light scatter”) ocorre em pequenos ângulos, 1-8° e 1-19°, como resultado da difracção da luz, a qual fornece, essencialmente, informação acerca da morfologia celular, correlacionando-se com o tamanho diferencial relativo (lobularidade) das células (figura 6e). A dispersão lateral da luz laser ou SSC (do inglês “side angle light scatter”) é efectuada em ângulos maiores, 90°, como resultado da refracção da luz e correlaciona-se com a capacidade de cada célula em dispersar/despolarizar a luz, sendo um óptimo indicador da granulosidade dentro do citoplasma das células, bem como de irregularidades na superfície da membrana (figura 6e). A luz dispersa e a fluorescência são recolhidas pelo sistema óptico e electrónico, que converte os sinais de luz em informação que é guardada no sistema de armazenamento de dados e no computador, após o que é efectuada a respectiva análise gráfica (figura 7).

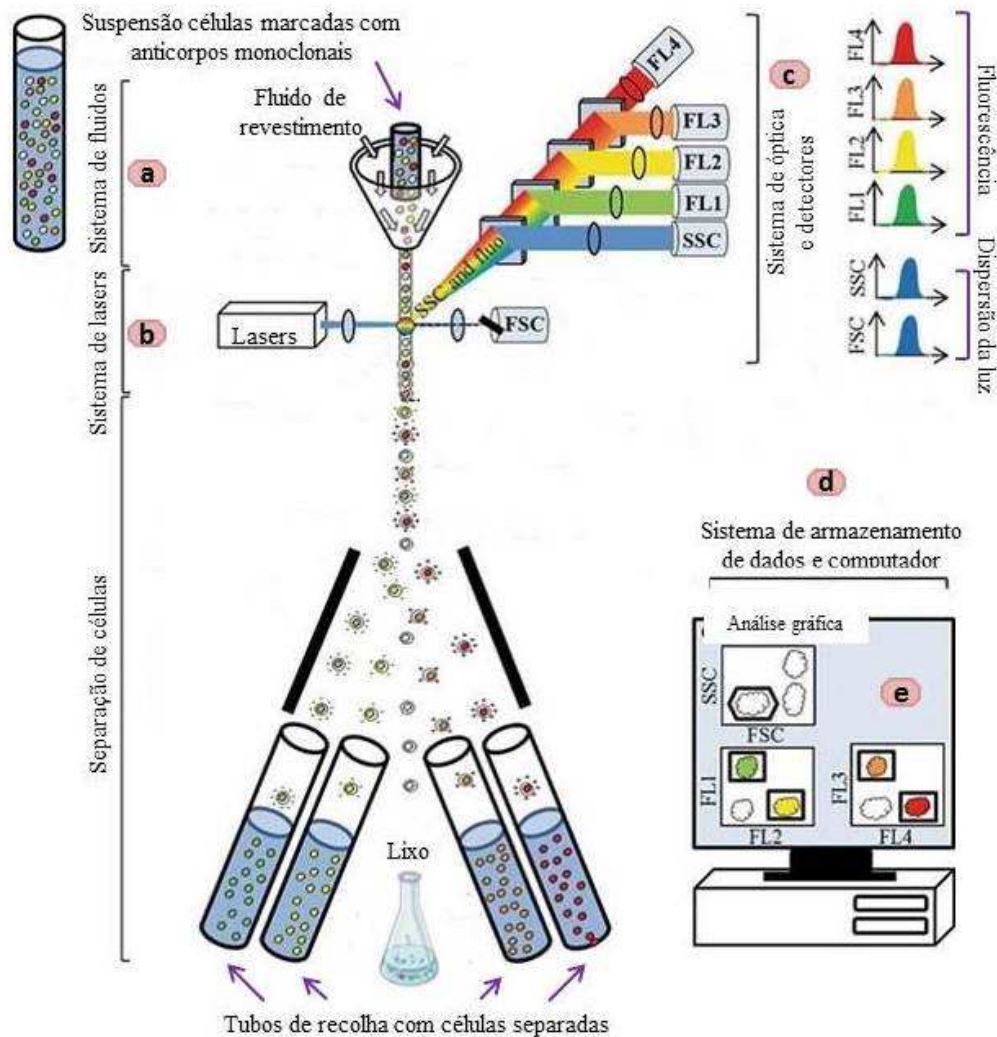


FIGURA 6. Citometria de fluxo. Princípios de citometria de fluxo, que combina os sistemas de fluidos, de lasers, de óptica e detectores, e o sistema de armazenamento de dados e computador. FL1 (fluorescência verde), FL2 (fluorescência amarela), FL3 (fluorescência laranja), FL4 (fluorescência vermelha), FSC (“forward scatter light”) e SSC (“side scatter light”) [Adaptado de Picot *et al.* (2012)].

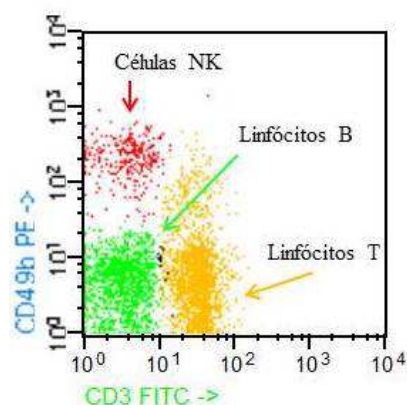


FIGURA 7. Populações de células sanguíneas. Após análise de uma amostra de sangue no citômetro de fluxo, as populações de células distribuíram-se de acordo com as suas propriedades em dispersar a luz e emissão de fluorescência. NK- do inglês “natural killer” (original da autora).

Esta técnica foi utilizada pela primeira vez por Vesey *et al.* (1991), num estudo em que diversas amostras de água tratada e não tratada foram analisadas por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo. Esta última técnica revelou-se mais rápida e fácil de executar do que a microscopia de fluorescência, no entanto, foi necessário proceder a uma melhoria na sua sensibilidade antes de poder ser utilizada como técnica de rotina para monitorizar a qualidade da água potável. Posteriormente, diversos estudos foram efectuados, nomeadamente a associação entre a citometria de fluxo e a separação imunomagnética, cuja combinação se revelou mais sensível do que as tradicionais técnicas de concentração de oocistos, nomeadamente, concentração por formol-éter (Power *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2005).

A citometria de fluxo tem sido utilizada por diversos autores para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais e ambientais, pelo facto de ser um método com sensibilidade muito superior à das técnicas de imunofluorescência convencionais, e de permitir a análise de um elevado número de amostras (Arrowood *et al.*, 1995; Vesey *et al.*, 1997; Valdez *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2008). Para além da utilização de citometria de fluxo para a detecção e contagem dos oocistos, os desenvolvimentos recentes têm apontado para uma abordagem baseada na

coloração e contagem de esporozoítos de culturas *in vitro*, permitindo o estudo da dinâmica da infecção e quantificação da taxa de invasão da célula hospedeira (Feng *et al.*, 2006). Esta aplicação constitui um avanço muito positivo, pois os estudos detalhados do esporozoíto, imediatamente antes e depois da invasão da célula hospedeira, podem ser relevantes no que concerne ao desenvolvimento de agentes farmacoterapêuticos contra *Cryptosporidium*.

1.6.5. TECNOLOGIA xMAP®

As tecnologias que utilizam microesferas em suspensão numa matriz, tal como a tecnologia xMAP, constituem sistemas de alto rendimento, capazes de executar a avaliação multianalítica de uma enorme variedade de bioensaios, como é o caso da plataforma Luminex (Olsson *et al.*, 2005; Skogstrand *et al.*, 2005; Datta & Opp, 2008; Melinceanu *et al.*, 2009). Esta tecnologia foi desenvolvida com base nos princípios de citometria de fluxo e de ELISA. Tal como a citometria de fluxo, esta técnica utiliza componentes comuns ao citómetro como os lasers, fluidos e óptica. No entanto, ao contrário dos ensaios de citometria de fluxo, que utilizam uma combinação de microesferas de diferentes tamanhos e intensidades de cor, a tecnologia xMAP utiliza microesferas de poliestireno de uma única dimensão, 5,6 µm (figura 8), internamente coradas com misturas de fluoróforos vermelho e infravermelho, de forma a criar 100 cores distintas. Cada microesfera tem assim, um código de espectro, de acordo com o seu conteúdo vermelho/infravermelho, o que permite ler até 100 analitos diferentes numa única reacção. Tal como a ELISA, os ensaios são efectuados em placas de 96 poços (Dunbar, 2006).

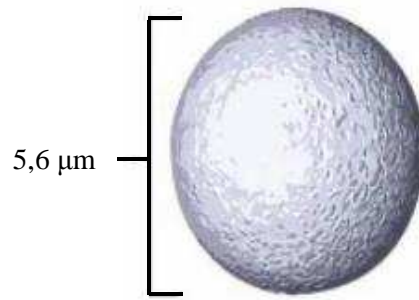


FIGURA 8. Microsfera de poliestireno. Microsfera utilizada na tecnologia xMAP®, com 5,6 µm de diâmetro (Adaptado de <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/>, acedido a 22 de Fevereiro de 2013).

Após serem colocadas em suspensão, as microesferas (figura 9a) são cobertas com o anticorpo ou reagente de captura (figura 9b), após o que é adicionada a amostra que contém o antígeno a analisar (figura 9c), seguida do anticorpo de detecção marcado com estreptavidina-ficoeritrina (figura 9d). O ensaio é processado e avaliado num equipamento Luminex, semelhante ao apresentado na figura 10, que combina dois lasers, verde [532 nanómetros (nm)] e vermelho (635 nm), fluidos, quatro detectores ópticos e o sistema de processamento de sinal em tempo real. No interior deste equipamento existe um analisador que pipeta o poço onde ocorrem as reacções, e à medida que as esferas passam num fluxo laminar, pelos dois lasers, os seus corantes fluorescentes são excitados, sendo a leitura da microesfera (alvo) efectuada pelo laser vermelho e a detecção da quantidade do alvo determinada por excitação da estreptavidina-ficoeritrina pelo laser verde. A medição da intensidade de fluorescência do ensaio e a discriminação entre microesferas individuais ou agregados das mesmas, é efectuada por intermédio dos quatro detectores ópticos. O processamento dos resultados é efectuada em tempo real, por intermédio do “software” do próprio equipamento (Dunbar, 2006).

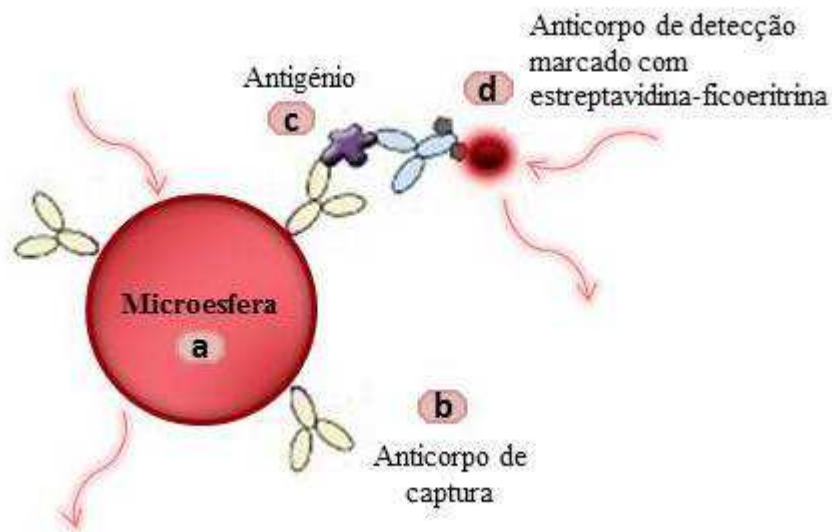


Figura 9. Microesferas de poliestireno em suspensão. Marcação das microesferas de poliestireno (a) com os anticorpos de captura (b) e de detecção (d) e o antígeno (c) (Adaptado de <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/>, acedido a 26 de Fevereiro de 2013).

A rápida aquisição de dados, exactidão/precisão, eficiência e flexibilidade constituem as principais vantagens desta tecnologia. A grande sensibilidade, associada a controlos de qualidade representativos, permite a obtenção de resultados mais rápidos e reprodutíveis do que os efectuados em matrizes de fase sólida. O facto de permitir a obtenção de maior número de dados por amostra, em menos tempo, quando em comparação com outras técnicas como a ELISA, para além da necessidade de quantidade reduzida de amostra, permite diminuir os custos associados. Esta tecnologia possibilita a utilização de painéis facilmente modificados, com maior ou menor número de testes, e com multiformatos variados (DNA, imunoensaio, enzimas, receptor-ligando), enfatizando a sua versatilidade e flexibilidade.

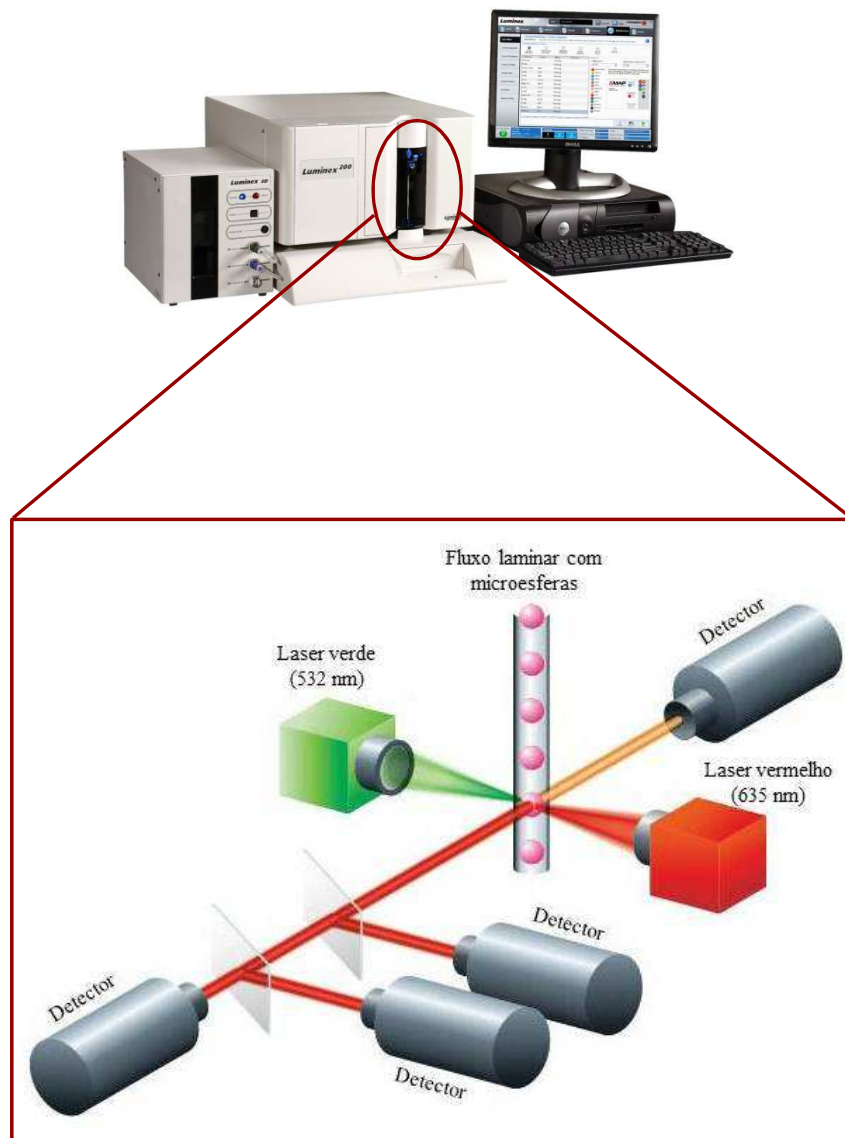


Figura 10. Plataforma Luminex. Equipamento Luminex, que combina dois lasers (532 nm e 635 nm), fluidos, quatro detectores ópticos e o sistema de processamento de sinal em tempo real (Adaptado de www.luminexcorp.com/prod/groups/public/document/lmncorp/luminex-100-200.jpg, acessado a 26 de Fevereiro 2013).

Neste sentido, tem sido vasta a aplicação desta tecnologia em diversas áreas. Skogstrand *et al.* (2005) utilizaram esta tecnologia para dosar diversos marcadores inflamatórios e factores de crescimento no sangue de recém-nascidos, para o diagnóstico de patologias congénitas específicas. Nas situações em que a amostra de

sangue é reduzida, como é o caso dos recém-nascidos, a utilização da tecnologia xMAP constituiu uma mais-valia, ao permitir o doseamento de diversos analitos a partir de uma única amostra de sangue. No contexto das doenças neurológicas, como na doença de Alzheimer, a tecnologia xMAP tem sido aplicada no doseamento de diversos biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (Olsson *et al.*, 2005), ou na quantificação de múltiplas citocinas em regiões específicas do cérebro de murganhos (Datta & Opp, 2008). A aplicação desta tecnologia ao estudo do perfil imunológico dos mediadores imunes (citocinas, quimiocinas e factores de crescimento), em doentes com carcinoma da laringe, constitui outra aplicação recente (Melinceanu *et al.*, 2009).

No contexto da infecção por *Cryptosporidium*, a plataforma Luminex tem sido utilizada para a identificação deste parasita em amostras ambientais e de fezes (Bandyopadhyay *et al.*, 2007), assim como na quantificação de anticorpos presentes na saliva, relativos à resposta imune a determinados microrganismos, entre eles, *Cryptosporidium* (Griffin *et al.*, 2011). A aplicação conjunta da plataforma Luminex e da PCR para a detecção de diversos parasitas intestinais, nomeadamente *Cryptosporidium*, tem sido outra vertente de aplicabilidade (Li *et al.*, 2010; Taniuchi *et al.*, 2011). No entanto, as potencialidades da tecnologia xMAP têm sido pouco exploradas no contexto da infecção por *Cryptosporidium*, principalmente no que concerne à resposta imune, sendo necessários estudos futuros que abordem a análise do perfil imunológico da infecção causada por este parasita no organismo hospedeiro.

1.6.6. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A abordagem histológica, coprológica e imunológica no contexto da infecção por *Cryptosporidium* tem algumas limitações, principalmente pelo facto de não permitir a identificação da espécie ou genótipo do parasita responsável pela infecção. Consequentemente, o desenvolvimento dos métodos moleculares tem permitido efectuar um diagnóstico mais específico da criptosporidiose em humanos e animais, identificar a espécie do parasita que está na origem das infecções diagnosticadas, e detectar a variação genética inter e intra-específica, em amostras de diferentes origens (Jex *et al.*, 2008; Smith, 2008). Para ultrapassar as limitações de sensibilidade e especificidade apresentadas pelas técnicas anteriormente referidas, vários autores têm descrito técnicas

de amplificação de DNA por PCR. Para além de ser uma técnica rápida, altamente sensível e precisa, a PCR permite a fácil interpretação dos resultados e o processamento de um elevado número de amostras em simultâneo (Fayer *et al.*, 2000). Esta metodologia, que tem por base a amplificação específica de um ou mais *loci* genómicos a partir de pequenas quantidades de DNA (Mullis *et al.*, 1986), tem contribuído para uma melhor compreensão da taxonomia, biologia, epidemiologia, ecologia e genética das várias espécies de *Cryptosporidium*. O melhor e maior conhecimento nestas áreas tem viabilizado o planeamento de estratégias de prevenção adequadas, a vigilância e o controlo da infecção em humanos e animais (Sulaiman *et al.*, 1999; Fayer *et al.*, 2000; Jiang & Xiao, 2003).

Vários protocolos de PCR dirigidos a diferentes regiões alvo do genoma de *Cryptosporidium* já se encontram descritos, embora apresentem sensibilidades e especificidades distintas, o que nalguns casos, pode originar resultados falsos negativos ou falsos positivos. Estes últimos podem resultar da detecção de ácidos nucleicos inespecíficos, de microrganismos não viáveis, ou de contaminações cruzadas no laboratório. A contaminação ambiental pode conduzir à inibição da reacção de amplificação e a dificuldades de quantificação do DNA (Sulaiman *et al.*, 1999; Toze, 1999; Jiang & Xiao, 2003). A baixa especificidade apresentada por alguns destes protocolos é justificada pelo facto de serem utilizados oligonucleótidos iniciadores (“primers”) dirigidos a zonas do genoma extremamente conservadas entre os eucariotas, resultando na amplificação de DNA de outros microrganismos, principalmente, os que pertencem ao género *Eimeria* (Sulaiman *et al.*, 1999).

A sensibilidade da reacção de PCR para amplificação do DNA de *Cryptosporidium* spp. depende de diversos factores, como sejam, o número de cópias da região do genoma a amplificar e a presença de integrantes fecais inibidores da reacção. A presença de partículas orgânicas e inorgânicas, bactérias, leveduras e algas pode interferir com a detecção e identificação de oocistos em amostras ambientais. Além disso, sais biliares, bilirrubina, metabolitos de fármacos, DNA de outros microrganismos e complexos de polissacarídeos que sequestrem o principal responsável pela eficiência da enzima *Taq* DNA polimerase, o ião magnésio, ou que mimetizem o comportamento do DNA, reduzem a eficiência e a sensibilidade da reacção de PCR (Carraway *et al.*, 1996; Carey *et al.*, 2004; Smith, 2008). Neste sentido, reveste-se de

máxima importância que os métodos de extração de DNA sejam eficazes na remoção dos inibidores referidos e que sejam antecidos pela capaz destruição da robusta parede dos oocistos. Esta dupla membrana é altamente resistente à disrupção mecânica e química, e a sua lise incompleta pode comprometer toda a produtividade do processo de amplificação de DNA (Harris & Petry, 1999; Sunnotel *et al.*, 2006; Fayer, 2008).

A técnica de PCR permite a identificação do género *Cryptosporidium*, mas quando associada a outros métodos de biologia molecular, como o RFLP ou a RAPD, produz informações importantes sobre a variação genética dentro deste género, ou seja, a identificação da espécie e/ou genótipo do parasita (Morgan *et al.*, 1995; Carraway *et al.*, 1996). Todavia, estes e outros métodos descritos na literatura foram desenvolvidos com base em sequências da espécie mais conhecida, *C. parvum*, permitindo a amplificação de algumas espécies, nomeadamente, a anteriormente referida e *C. hominis*. Este aspecto, associado à imensa variabilidade genética apresentada pelos parasitas do género *Cryptosporidium* e à possibilidade de outras espécies causarem infecção humana, como por exemplo *C. meleagridis* e *C. felis*, faz com que a sua aplicabilidade ao diagnóstico da criptosporidiose humana seja limitada, pois não amplifica estas outras espécies (Fayer *et al.*, 2000; Jiang & Xiao, 2003).

A aceitação e aproveitamento do imenso potencial da técnica de PCR como ferramenta de diagnóstico da criptosporidiose ainda tem que superar algumas interferências, para que seja possível adoptar e padronizar métodos de referência, bem definidos e adequados à sua utilização de rotina em todos os laboratórios.

1.7. TRATAMENTO DA CRIPTOSPORIDIOSE HUMANA

Actualmente, não existe terapêutica eficaz para o tratamento da criptosporidiose. Raramente é necessária a instituição de terapêutica nos imunocompetentes que se encontrem a recuperar de uma criptosporidiose, excepto em situações mais agudas, nas quais a administração de fármacos antidiarreicos, juntamente com a terapêutica de reidratação, para equilibrar os níveis de fluidos e de electrólitos, são suficientes (Benson *et al.*, 2004). No entanto, podem ocorrer complicações graves em imunocomprometidos com infecção por *Cryptosporidium*. Nos doentes com neoplasias ou que foram sujeitos a transplante de órgãos, a interrupção da terapêutica imunossupressora conduz à reconstituição do sistema imunitário e, conseqüentemente, à resolução da infecção (Current & Garcia, 1991). Nos doentes com sida, o objectivo principal é baixar a virémia, aumentar a contagem de linfócitos T CD4⁺ e equilibrar a resposta imunitária. Com o advento da terapêutica antirretrovírica (TARV) de combinação conseguiu-se, inclusive, reduzir a quantidade de oocistos excretados, pelo que a incidência dos casos de criptosporidiose assim como de outras patologias oportunistas nos doentes infectados por VIH diminuiu drasticamente (Foudraine *et al.*, 1998; Benson *et al.*, 2004). A melhoria da qualidade de vida destes doentes é essencial, pelo que o tratamento sintomático com fármacos antidiarreicos permite diminuir a frequência e o volume das dejeções. Nas situações de diarreia crónica, torna-se, ainda, necessário repor a perda de líquidos e electrólitos, por intermédio da administração oral ou intravenosa de soluções contendo glucose, potássio, bicarbonato de sódio, magnésio e fósforo (Chen *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2004; Benson *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, têm sido efectuados diversos ensaios, com mais de 150 fármacos, sem que a sua eficácia contra os parasitas do género *Cryptosporidium* tivesse sido comprovada, apesar de muitos deles terem apresentado acção contra outros coccídeos. Contudo, observou-se eficácia de alguns destes fármacos ao nível da melhoria dos sintomas e na quantidade de oocistos excretados (Armson *et al.*, 2003; Ramirez *et al.*, 2004; Benson *et al.*, 2004).

Um dos primeiros fármacos a demonstrar alguma actividade terapêutica contra *Cryptosporidium*, foi a paramomicina, um antibacteriano que também exhibe actividade significativa contra outros organismos (Tzipori & Ward, 2002). Estudos efectuados no modelo animal mostraram que este fármaco foi eficaz no tratamento da

criptosporidiose, quando administrado em doses elevadas. Contudo, estudos efectuados em infectados por VIH mostraram que o fármaco possuía eficácia relativamente reduzida. Para além disso, comparativamente com os doentes que receberam placebo, ambos os grupos mostraram sinais semelhantes no nível da melhoria de sintomas (Hewitt *et al.*, 2000; Armson *et al.*, 2003; Benson *et al.*, 2004). Outros estudos mostram, ainda, que a administração conjunta da paramomicina com outros antibióticos (como azitromicina) ou com antirretrovíricos (inibidores da protease), parece apresentar uma maior eficácia do que o tratamento com o fármaco sozinho (Smith *et al.*, 1998; Hommer *et al.*, 2003).

O ácido aurintricarboxílico é uma das moléculas que tem sido testada experimentalmente em murganhos, nos quais a infecciosidade e a viabilidade de *C. parvum* diminuíram de forma distinta, sem efeitos negativos nos animais (Klein *et al.*, 2008).

A curcumina é um composto polifenólico natural extraído de plantas, que tem apresentado resultados promissores ao nível da inibição da infecciosidade/invasão das células hospedeiras pelos esporozoítos e do desenvolvimento de *C. parvum in vitro* (Shahiduzzaman *et al.*, 2009a).

Shahiduzzaman *et al.* (2009b) mostraram que a miltefosina, uma molécula anti-leishmania, conduziu a 78-98% de inibição no desenvolvimento de *C. parvum in vitro*, indiciando que este composto poderá constituir um potencial fármaco a utilizar aquando da infecção por este parasita.

Actualmente, o único fármaco aprovado pela FDA (do inglês “Food and Drug Administration”) dos EUA para o tratamento da criptosporidiose em adultos e crianças, é a nitazoxanida. Contudo, a sua eficácia e segurança não estão completamente esclarecidas nos imunocomprometidos (White, 2003; Fox & Saravolatz, 2005). Este fármaco possui largo espectro de acção, e mostrou ser eficaz no tratamento de infecções por helmintas, bactérias e outros protozoários como *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* e *Isospora belli*. As propriedades anti-protozoário da nitazoxanida conduziram à realização de ensaios clínicos para a testar no contexto da criptosporidiose, tendo-se obtido resultados muito satisfatórios (Armson *et al.*, 2003; Benson *et al.*, 2004). Em 2006, foi publicado um estudo feito nos EUA, em doentes com sida e criptosporidiose, destinado a avaliar a eficácia da nitazoxanida no contexto

desta coinfeccção. Verificou-se que 59% (209/357) dos doentes apresentaram melhoria dos sintomas gastrintestinais (diminuição de diarreias aquosas, vômitos e dores abdominais), do estado de saúde geral e diminuição da excreção de oocistos, pelo que se concluiu que este fármaco poderá constituir uma terapêutica útil no contexto desta coinfeccção (Rossignol, 2006).

Em 2010, foi documentado um estudo, realizado *in vitro*, que compara a eficácia entre a nitazoxanida e derivados tiadiazólicos contra *C. parvum*, tendo-se verificado que a actividade inibitória destes novos compostos no desenvolvimento do parasita parece ser bastante promissora (Gargala *et al.*, 2010).

1.8. PREVENÇÃO E CONTROLO DA CRIPTOSPORIDIOSE

As medidas preventivas constituem, de longe, a abordagem mais eficaz para controlar a criptosporidiose. A infecção por *Cryptosporidium* tem início após a ingestão dos oocistos, pelo que as medidas para prevenir e limitar a propagação da criptosporidiose deverão estar direccionadas para a redução ou eliminação de oocistos no ambiente, assim como para evitar a sua dispersão, de modo a restringir o seu contacto com o hospedeiro. Todavia, este é um objectivo difícil de concretizar, não só devido ao facto de se tratar de um parasita ubiqüitário, como também pela sua elevada resistência ao stress ambiental e à maioria dos desinfectantes e anti-sépticos habitualmente utilizados. Actualmente, não existem fármacos com eficácia ao nível da profilaxia ou tratamento da criptosporidiose, que possam prevenir ou eliminar a produção de oocistos pelos hospedeiros infectados. Neste sentido, a higiene do hospedeiro assim como os processos de desinfecção eficientes permanecem como as ferramentas mais eficazes para travar a propagação da doença (Fayer, 2008).

A principal fonte de criptosporidiose humana é a contaminação das fontes de abastecimento de água, pelo que a implementação de medidas que visem diminuir a propagação de oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente é fundamental. Desde que foram documentados os primeiros surtos de criptosporidiose na rede pública de abastecimento de água (D'Antonio *et al.*, 1985), e devido ao consumo de água potável contaminada (Mac Kenzie *et al.*, 1994), abriu-se caminho para o aperfeiçoamento das técnicas de tratamento daquela que é considerada uma das principais vias de transmissão deste parasita, a água. Os métodos químicos e físicos utilizados no tratamento da água de consumo público incluem a floculação, a coagulação, a sedimentação, a filtração e a cloração, mas não se têm mostrado completamente eficazes na remoção ou inactivação dos oocistos de *Cryptosporidium* (Rose *et al.*, 2002). Os oocistos apresentam dimensão (4–8 µm) inferior à do tamanho dos orifícios dos filtros convencionais em cerca de um terço, o que dificulta a sua remoção física da água (estes filtros já são eficazes na remoção de quistos de *Giardia* das águas). Por outro lado, a relativa ineficácia dos desinfectantes convencionais vulgarmente utilizados no tratamento das águas de abastecimento e de recreio, como o cloro ou a monocloramina, mesmo em elevadas concentrações e após exposições prolongadas, têm conduzido à procura de alternativas eficazes (Korich *et al.*, 1990). A amónia, o dióxido de cloro e o

óxido de etileno são os compostos que perspectivaram resultados mais promissores, contudo, a toxicidade por eles apresentada tem constituído um entrave à sua utilização (Korich *et al.*, 1990; Jenkins *et al.*, 1998). Ultimamente, a desinfecção com ozono ou irradiação com luz ultravioleta (UV) têm sido alvo de extensa investigação, com resultados bastante promissores. Segundo diversos autores, o ozono possui um extremo potencial de oxidação ao nível da parede do oocisto e do DNA, e a luz UV tem a capacidade de inactivar os oocistos de *Cryptosporidium* devido ao efeito biocida no DNA genómico, o que resulta em falência do parasita para se reproduzir e estabelecer a infecção no hospedeiro (Huffman *et al.*, 2000; Corona-Vasquez *et al.*, 2002; Betancourt & Rose, 2004).

A temperatura é outro dos factores que maior influência exerce na sobrevivência dos oocistos. Estes possuem capacidade de sobreviver em água, incluindo a água do mar, a temperaturas entre 4°C e 22°C (Pokorny *et al.*, 2002). O aumento da temperatura acelera a degradação dos oocistos e diminui a sua viabilidade e, sob temperaturas extremas, pode ocorrer desnaturação das numerosas proteínas que constituem a parede, assim como exposição dos esporozoítos a condições prejudiciais à sua sobrevivência, traduzindo-se na diminuição da capacidade infectante dos oocistos (Fayer *et al.*, 1996). A congelação rápida inactiva os oocistos, em comparação com a congelação lenta, que é a condição tipicamente encontrada no ambiente natural. Neste sentido, Robertson *et al.* (1992) mostraram que quando congelados a -22°C, 10% dos oocistos permanece viável por um período de seis dias; contudo, uma congelação rápida a -70°C é letal para todos os oocistos. Diversos estudos têm sido feitos neste contexto, nomeadamente o estudo feito por Fayer & Nerad (1996), no qual os autores mostraram que os oocistos armazenados a 5°C e a -10°C mantêm a sua capacidade infectante até sete dias, e quando congelados a -15°C e a -20°C, esta capacidade é reduzida para 24 e cinco horas, respectivamente. Estes dados demonstram a capacidade de resistência dos oocistos de *Cryptosporidium* às baixas temperaturas, com a consequente possibilidade de se manterem viáveis, entre -15°C e -20°C.

A dessecação é uma das formas de inactivação dos oocistos, à qual estes apresentam elevada susceptibilidade. Quando colocados numa lâmina, e após duas horas de exposição ao ar, à temperatura ambiente, Robertson *et al.* (1992) verificaram

que apenas 3% dos oocistos permaneceram viáveis e, após quatro horas, a dessecação foi letal para 100% dos oocistos.

Diversos estudos têm mostrado que a presença dos oocistos de *Cryptosporidium* não segue o mesmo padrão em diferentes tipos de solos. Olson *et al.* (1999) observaram a inactivação mais rápida dos oocistos em solos secos (naturais) do que em solos húmidos. Verificaram, igualmente, que a aplicação de adubo (que contém microrganismos naturais que podem degradar o parasita) permite reduzir a contaminação dos solos sujeitos ao escoamento agrícola. Outros estudos (Dai & Boll, 2003) sugerem que a interacção entre os oocistos e as partículas do solo é devida à presença de forças electrostáticas derivadas do escoamento dos solos por águas, rejeitando a hipótese de que os oocistos aderem às partículas de um solo natural. Neste sentido, os autores sugerem que as práticas de agricultura se devam concentrar na redução do escoamento superficial dos solos, de forma a não arrastar oocistos que possam contaminar locais adjacentes.

Particularmente importantes são as explorações pecuárias, nas quais a redução da densidade de animais num mesmo espaço, o isolamento dos animais doentes, a limitação do acesso dos animais a zonas próximas de cursos de água, a separação dos animais jovens dos adultos, o tratamento do estrume dos animais antes da sua utilização como fertilizante dos solos (estrume contaminado é um potencial contaminante dos solos), e as boas práticas higio-sanitárias, constituem medidas fundamentais para se conseguir reduzir o ciclo de transmissão da infecção entre ambiente – animais – humanos (Ramirez *et al.*, 2004).

Os imunocomprometidos constituem um dos grupos particularmente susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium* e, como tal, devem adoptar cuidados especiais para prevenir a ocorrência de eventuais infecções. Particularmente, devem evitar contacto com animais com diarreia, com cães ou gatos com menos de seis meses de idade e com animais vadios. É ainda fundamental que o animal seja examinado pelo veterinário antes de ocorrer contacto com este grupo de pessoas (Juranek, 1995).

De entre algumas das medidas recomendadas, com o objectivo de prevenir e controlar a criptosporidiose, podem-se destacar as seguintes (Carey *et al.*, 2004; Centers for Disease Control and Prevention, 2010):

a) Boas práticas de higiene: lavar as mãos com água e sabão antes de preparar e de ingerir os alimentos, após ir à casa de banho, após mudar fraldas a crianças, antes e depois de tratar de alguém que esteja com diarreia, após mexer em animais ou no respectivo material fecal; evitar ingerir alimentos crus ou mal lavados, particularmente em países onde o tratamento da água é duvidoso;

b) Nos infantários: para reduzir o risco de transmissão da doença, as crianças com diarreia não devem frequentar o infantário nem ter contacto com as outras crianças, até que a diarreia cesse;

c) Nos locais de actividades recreativas (piscinas, lagos, oceanos): em caso de diarreia provocada por *Cryptosporidium*, evitar nadar até duas semanas após a paragem da diarreia; caso existam crianças/bebés, devem ir à casa de banho com frequência e fazer mudança da fralda;

d) Nas explorações pecuárias: evitar o contacto com as fezes de ruminantes domésticos, particularmente vitelos e cordeiros (animais jovens); usar luvas aquando da limpeza das explorações;

e) Em situação de diarreia (particularmente se a causa é desconhecida), evitar práticas sexuais que envolvam o contacto fecal-oral.

1.9. RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM*

A infecção por *Cryptosporidium* é autolimitada no hospedeiro imunocompetente, podendo tornar-se bastante grave em hospedeiros muito jovens ou imunocomprometidos, tais como os infectados por VIH, causando diarreia crónica e potencialmente fatal (Okhuysen *et al.*, 1998; Nichols, 2008). O padrão de infecção por *Cryptosporidium* resulta de uma sequência equilibrada de eventos entre a imunidade do hospedeiro e as características do parasita, tais como o genótipo, o tamanho do inóculo e a viabilidade/infecciosidade dos oocistos (Fayer *et al.*, 2000). Uma vez que ainda não se encontra disponível nenhuma terapêutica específica com actividade anti-*Cryptosporidium*, o estudo da resposta imune a este parasita permitirá aprofundar o conhecimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, conduzindo a uma melhor selecção de potenciais alvos terapêuticos. Poucos estudos têm sido feitos visando a abordagem da resposta imune no Homem. Alguns estudos centraram a sua atenção na resposta humoral, outros têm-se debruçado sobre a imunidade celular e humoral. De um modo geral, destes estudos sobressaem a importância do interferão-gama ou IFN- γ (do inglês “interferon-gamma”) no controlo de infecção por *C. parvum*, e o papel relevante dos linfócitos T CD4⁺ na resposta imune ao parasita, apesar de permanecerem por esclarecer os mecanismos pelos quais estes elementos imunes actuam no contexto da infecção por *Cryptosporidium*. Em resumo, várias têm sido as tentativas para compreender a resposta imune à infecção por *Cryptosporidium*, mas permanece ainda muito por esclarecer neste campo (Theodos, 1998; Riggs, 2002; Borad & Ward, 2010; Petry *et al.*, 2010).

Uma das grandes dificuldades que se têm levantado na abordagem da resposta imune a *Cryptosporidium* é a falta de estudos em modelos animais imunocompetentes. A maior parte da investigação centra-se em animais recém-nascidos ou imunocomprometidos, com depleção de células B ou T funcionais, ou com mutações ao nível do complexo major de histocompatibilidade ou MHC (do inglês “major histocompatibility complex”), dos receptores alfa-beta das células T ou $\alpha\beta$ -TCR (do inglês “alpha-beta-T-cell receptor”) e do IFN- γ (McDonald *et al.*, 1992; Aguirre *et al.*, 1994; McDonald & Bancroft, 1994; McDonald, 2000). Neste sentido, é importante estudar o que ocorre nos modelos animais imunocompetentes, uma vez que a infecção por *Cryptosporidium* também tem lugar em indivíduos imunocompetentes, podendo

compreender-se melhor, nestes indivíduos, de que forma o sistema imune consegue ultrapassar a infecção.

Ao responder às agressões externas, distinguindo eficazmente o que é estranho ao organismo, o sistema imune desenvolve-se segundo dois tipos de respostas inter-relacionadas e funcionalmente definidas: a resposta imunológica inata ou natural, com uma resposta inespecífica, e a resposta imunológica adaptativa ou adquirida, com uma especificidade restrita. No contexto da infecção por *Cryptosporidium*, ambas as respostas desempenham um importante papel, quer ao nível da protecção quer da limitação do número de parasitas (McDonald & Bancroft, 1994; Leitch & He, 2012).

1.9.1. RESPOSTA IMUNE INATA: INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM*

A imunidade inata depende de um número limitado de receptores e proteínas secretadas, que reconhecem as características comuns dos agentes patogénicos, funcionando como um sensor precoce da infecção e contribuindo para a indução da resposta imune adaptativa (Murphy, 2012). No contexto da infecção por *Cryptosporidium*, a resposta inata envolve as células do epitélio intestinal ou IECs (do inglês “intestinal epithelial cells”), os linfócitos NK, as células dendríticas ou DCs (do inglês “dendritic cells”), os macrófagos, os receptores “toll-like” ou TLR (do inglês “toll-like receptor”) e a produção de IFN- γ e de óxido nítrico ou NO (do inglês “nitric oxide”), bem como de péptidos antimicrobianos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (McDonald, 2008; Leitch & He, 2012).

As IECs são as primeiras células a serem invadidas aquando da infecção por *Cryptosporidium*, actuando como sentinelas (McDonald, 2008). A expressão de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patogénios ou PAMPs (do inglês “pathogen-associated molecular patterns”), como os TLR e os receptores intracelulares “Nod-like” ou NLRs (do inglês “intracellular Nod-like receptors”), para identificação dos parasitas, assim como a expressão de moléculas do MHC I e II, necessárias para o processamento e apresentação dos antígenos, atribui a estas células um papel fundamental no desencadear da resposta imune ao nível da mucosa (Tessema *et al.*, 2009; Barakat *et al.*, 2009a; Petry *et al.*, 2010). Alguns péptidos antimicrobianos, da classe das β -defensinas, com capacidade de destruir os

parasitas por disrupção das suas membranas celulares, são também produzidos pelas IECs (Bowdish *et al.*, 2006). Tarver *et al.* (1998) observaram a expressão elevada destes péptidos no intestino de vitelos infectados por *Cryptosporidium*, o que é sugestivo da contribuição destas moléculas na defesa do hospedeiro. As IECs são também fonte de citocinas imunoreguladoras, como a interleucina (IL)-18 ou IL-18 (indutora da produção de IFN- γ), reguladas ao nível do íleo em resposta à infecção (McDonald *et al.*, 2006; Tessema *et al.*, 2009).

As DCs são células apresentadoras de antígenos ou APCs (do inglês “antigen-presenting cells”) por excelência, sendo activadoras de linfócitos, que por sua vez orquestram a resposta imune adaptativa por intermédio de um conjunto de citocinas. Pouco se sabe acerca do papel das células dendríticas na resposta imune à infecção por *Cryptosporidium*, existindo apenas dois estudos feitos neste contexto. O primeiro destes estudos mostrou que os antígenos de *C. parvum* presentes nas DCs ao nível dos gânglios linfáticos mesentéricos podem induzir uma resposta imune específica, envolvida na eliminação do parasita, não tendo sido, contudo, investigado o grau de activação das DCs (Ponnuraj & Hayward, 2001). Num segundo estudo, Auray *et al.* (2007) analisaram a contribuição das IECs no recrutamento das DCs no contexto da infecção por *C. parvum*, assumindo que as DCs estão envolvidas na resolução da infecção. As IECs representam uma barreira mecânica aquando da invasão por patógenos intestinais, mas também fornecem sinais às células adjacentes na mucosa, que incluem a produção de quimiocinas, como a CCL2, do inglês [“chemokine (C-C motif) ligand 2”] e CCL7, envolvidas no recrutamento e activação das células do sistema imunitário. No contexto desta infecção, os autores identificaram em IECs a produção de uma ampla gama de quimiocinas capazes de atrair DCs.

A produção de NO pelos macrófagos e neutrófilos parece ter um papel protector contra a invasão de microrganismos, uma vez que o NO é tóxico para parasitas, fungos e bactérias (Nathan & Shiloh, 2000). Diversos estudos evidenciaram a produção aumentada de NO ao nível do epitélio intestinal, pela acção da sintetase do óxido nítrico ou iNOS (do inglês “inducible nitric oxide synthase”), no contexto da infecção por *Cryptosporidium*. Adicionalmente, sabe-se que a ausência ou inibição da iNOS produz agravamento da infecção epitelial e a libertação de oocistos e, ainda, que o stress oxidativo provocado pela administração de antioxidantes parece ser um factor que inibe

a infecção por *Cryptosporidium* (Leitch & He, 1999; Huang & Yang, 2002; Gookin *et al.*, 2006).

Finalmente, o IFN- γ é uma citocina pro-inflamatória, produzida fundamentalmente pelos linfócitos T auxiliares (do inglês “T helper”) 1 ou Th₁ e pelas células NK, após estimulação com IL-12, IL-18 e factor de necrose tumoral-alfa ou TNF- α (do inglês “tumor necrosis factor alfa”). A produção deste mediador é negativamente regulada por citocinas como a IL-4 ou a IL-10. Estudos efectuados em modelos animais recém-nascidos e imunocomprometidos (sem células T ou sem células T e B), infectados por *Cryptosporidium*, e com funcionamento normal das células NK, mostraram que o IFN- γ desempenha um papel importante tanto na imunidade inata como na imunidade adaptativa, fundamental para controlar a reprodução do parasita. Estes autores sugerem, ainda, que a resistência à infecção por *Cryptosporidium* é dependente da produção de IFN- γ (Chen *et al.*, 1993; McDonald & Bancroft, 1994; Tessema *et al.*, 2009; Barakat *et al.*, 2009b). A actividade protectora do IFN- γ no contexto da infecção por *C. parvum* também tem sido associada com a produção de quimiocinas pelas IECs, que recrutam linfócitos T CD4⁺ e macrófagos para os locais da infecção, promovendo a eliminação do parasita (Lacroix-Lamande *et al.*, 2002). Adicionalmente, o IFN- γ também tem mostrado um efeito directo no crescimento do parasita, limitando-o, ao induzir nos enterócitos resistência à infecção por *C. parvum* (Pollok *et al.*, 2001).

1.9.2. RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA: INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM*

A resposta imune adaptativa caracteriza-se, pela capacidade de gerar um vasto repertório de receptores de antígenos [receptor da célula B ou BCR (do inglês “B-cell receptor”) e TCR]. A especificidade destes receptores vai mediar respostas humorais e celulares direccionadas, as quais potenciam a resposta imune com mecanismos mais efectivos que os inatos para a eliminação do parasita (McDonald, 2008; Murphy, 2012). Adicionalmente, a resposta imune adaptativa possui sobre a resposta inata, a vantagem de ter memória imunológica, permitindo a pronta reactivação das células T e B em situações de reinfecção (Kalia *et al.*, 2006).

Um dos pilares da resposta adaptativa são os linfócitos T CD4⁺. Quando interagem com o respectivo antígeno que lhes é apresentado por células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas e macrófagos, as células T CD4⁺ são activadas, diferenciando-se em distintas subpopulações de linfócitos T auxiliares [Th₁, Th₂, Th₁₇, Th₂₂, T reguladores (reg),...], capazes de orquestrar a resposta adaptativa.

A natureza da resposta imune adaptativa é maioritariamente determinada pelo balanço entre os linfócitos Th₁ e Th₂, que ajudam outras células a desempenharem as suas funções, nomeadamente os linfócitos B a produzir anticorpos (Ig) e os macrófagos nas suas actividades microbidas (McDonald, 2008; Melinceanu *et al.*, 2009). Os linfócitos Th₁ estão envolvidos na resposta imunológica adaptativa (celular), principalmente através da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, e são particularmente efectivos na resposta contra infecções intracelulares. Os linfócitos Th₂ estão fortemente envolvidos no desenrolar da resposta humoral, sobretudo no que se refere à resposta contra helmintas e alérgenos, através da produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (McDonald, 2008; Melinceanu *et al.*, 2009; Leitch & He, 2012).

A importância das células T e da imunidade mediada por células, no contexto da infecção por *Cryptosporidium*, foi demonstrada pela primeira vez em murganhos com depleção destas células. Nos murganhos com sistema imunitário completo, a infecção aguda foi seguida da rápida eliminação do parasita, enquanto nos murganhos sem células T, a infecção crónica presente foi, por vezes, fatal (Heine *et al.*, 1984). Outros estudos têm sido feitos em diferentes modelos animais, principalmente murganhos imunocomprometidos, assim como em humanos (Theodos, 1998; McDonald, 2000; Riggs, 2002; Gomez Morales & Pozio, 2002; Gomez Morales *et al.*, 2004; Ehigiator *et al.*, 2007). Num estudo efectuado em voluntários humanos adultos imunocompetentes, experimentalmente infectados por *Cryptosporidium*, foi possível estabelecer uma correlação significativa entre a produção de IFN- γ ao nível da mucosa intestinal, a presença de anticorpos anti-*Cryptosporidium* pré-existentes, e a redução da excreção de oocistos. Neste trabalho, partindo do pressuposto de que a exposição prévia ao parasita leva ao desenvolvimento de memória imunológica, os autores consideram a produção de IFN- γ como parte desta mesma memória imunológica, e relacionam este mediador com a diminuição da susceptibilidade à infecção. Em resumo, os autores concluem que,

em indivíduos pré-sensibilizados, a interrupção do desenvolvimento do parasita acontece por mecanismos ligados ao INF- γ (White *et al.*, 2000).

Os infectados por VIH ou com outros deficits ao nível do sistema imunitário (com alterações hematológicas, transplantados ou após quimioterapia) apresentam maior susceptibilidade à infecção por *Cryptosporidium* e à resolução da mesma, estando a capacidade de controlar a infecção directamente relacionada com a contagem dos linfócitos T CD4⁺ (Pozio *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2001). Quando estas células apresentam níveis inferiores a 50 células/mm³, a probabilidade de ocorrer doença fulminante é bastante elevada; enquanto que, com valores de linfócitos T CD4⁺ superiores a 180 células/mm³, a doença é autolimitada, sendo a diarreia aquosa profusa, de duração inferior a dois meses, a manifestação mais evidente, seguida de completa remissão dos sintomas e interrupção da excreção de oocistos (Flanigan *et al.*, 1992; Blanshard *et al.*, 1992; Colford *et al.*, 1996). Recentemente, Preidis *et al.* (2007) verificaram que ambos os grupos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de seropositivos para VIH, produziam IFN- γ em quantidade significativamente superior à produzida pelas mesmas células dos seronegativos para VIH, após estimulação *ex vivo* com antígeno recombinante gp15 de *C. hominis*. Deste modo, enquanto a importância das células T CD4⁺ é conhecida, nomeadamente ao nível da protecção contra a criptosporidiose (Enriquez & Sterling, 1993; Aguirre *et al.*, 1994), a função das células T CD8⁺ na protecção ou eliminação da infecção por *Cryptosporidium* ainda não se encontra totalmente esclarecida (Aguirre *et al.*, 1994; Preidis *et al.*, 2007). Um estudo anterior sugere que as células T CD8⁺, apesar de estarem envolvidas no desenvolvimento de imunidade adaptativa, possuem um papel secundário em comparação com o das células CD4⁺. Os autores sugerem que a função das células T CD8⁺ contribui positivamente para a recuperação da infecção, apesar de não ser tão efectiva como a acção das células T CD4⁺ (McDonald & Bancroft, 1994). Por outro lado, Aguirre *et al.* (1994) verificaram que, modelos animais sem células T CD8⁺ apresentaram um grau de infecção baixo, similar ao ostentado pelo grupo controlo imunocompetente, pondo em causa a importância da função dos linfócitos T CD8⁺ neste contexto.

Mais recentemente, outras populações de células T CD4⁺ têm sido descritas (Th₁₇, Th₂₂, Treg), e alguns estudos têm vindo a demonstrar, por exemplo, a acção

preventiva das células Treg no que se refere aos danos provocados no hospedeiro por microrganismos estranhos e pela própria resposta imune contra estes (Maloy & Powrie, 2001; Belkaid & Tarbell, 2009). Contudo, os dados existentes não são, ainda, suficientes para clarificar a importância e o envolvimento destas células no contexto da infecção por *Cryptosporidium* (Petry *et al.*, 2010).

1.9.3. CITOCINAS E CONTROLO DA INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM*

As citocinas são proteínas extremamente relevantes na modulação da resposta imune inata e adaptativa. Embora os estudos efectuados em modelos animais estabeleçam que o IFN- γ é a citocina pro-inflamatória com papel primordial na regulação de ambos os tipos de resposta à infecção por *Cryptosporidium*, o seu mecanismo de actuação no contexto da infecção humana não está totalmente compreendido (Theodos, 1998; Lean *et al.*, 2002; Riggs, 2002; Petry *et al.*, 2010). Esta citocina actua de forma orquestrada com outras citocinas, com síntese estimulada por IL-12 (produzida pelas células dendríticas e pelos macrófagos) e por TNF- α (produzido pelas células T), e negativamente regulada por IL-10 (produzida pelas células Treg) (Urban *et al.*, 1996; Lean *et al.*, 2006; Tessema *et al.*, 2009; Murphy, 2012). Apesar de não existirem estudos que demonstrem qual a acção concreta da IL-10 no contexto da infecção por *Cryptosporidium*, Villegas *et al.* (2000) demonstraram que esta citocina está implicada na regulação negativa da expressão de moléculas envolvidas na imunopatologia da infecção por *Toxoplasma gondii*.

A IL-2 é uma citocina que está envolvida na proliferação das células T e na activação das células NK. Gomez Morales *et al.* (1999) demonstraram que as células mononucleares do sangue periférico ou PBMC (do inglês “peripheral blood mononuclear cell”) de indivíduos infectados por *C. parvum* e as células do baço de murganhos infectados por *C. muris*, produziam elevadas quantidades de IL-2 assim como de IFN- γ , após estimulação com antígeno dos oocistos. Contudo, noutros estudos verificou-se que o tratamento com anticorpos neutralizantes anti-IL-2 não surtiu efeito na susceptibilidade dos murganhos à infecção (Enriquez & Sterling, 1993), nem na reprodução do parasita (McDonald & Bancroft, 1994). Aparentemente, apesar de existir

elevada produção de IL-2 no contexto da infecção, esta citocina não parece estar directamente relacionada com o controlo da infecção ou com a reprodução do parasita.

Tal como o papel da resposta Th₂ é menos claro que o da resposta Th₁, também os estudos relativos ao envolvimento da IL-4 (Th₂) na resposta imunitária têm sugerido conclusões contrárias, principalmente aqueles que foram efectuados no contexto da infecção por *Cryptosporidium*. Do mesmo modo, a origem e o mecanismo de acção desta citocina permanecem pouco claros. Contudo, alguma investigação efectuada no contexto desta infecção, sugere que a IL-4 poderá estar envolvida na produção de IgG1 e IgE, na indução de moléculas do MHC II e na própria resposta Th₁ (Enriquez & Sterling, 1993; McDonald *et al.*, 2004). Ainda no estudo efectuado por Enriquez & Sterling (1993), no qual se comparou pela primeira vez qual das duas citocinas, IL-4 ou IL-5, predominaria no controlo da infecção por *Cryptosporidium*, verificou-se que a segunda havia sido mais efectiva a este nível. Apesar do envolvimento da IL-5 para a produção de eosinófilos, não foram feitos estudos adicionais para esclarecer a sua função no contexto da infecção por *Cryptosporidium*.

A função da citocina IL-13 sobrepõe-se com a da IL-4 (Wynn, 2003), no entanto, estudos *in vitro* sugerem que esta citocina não tem a capacidade de inibir a acção do IFN- γ no contexto da infecção por *Cryptosporidium*, como acontece com a IL-4. Esta citocina mostrou, ainda, capacidade para actuar de modo sinérgico com reduzidas concentrações de IFN- γ ao nível da inactivação do parasita (Lean *et al.*, 2003). Mais uma vez, não são conhecidos estudos *in vivo* que permitam esclarecer a importância desta citocina reguladora aquando da infecção por este parasita.

Assim, permanece premente a necessidade de estudos adicionais, para definir mais concretamente qual a função e estabelecer um perfil específico destes mediadores imunes envolvidos na resposta imune inata e adquirida, durante a infecção por *Cryptosporidium*.

1.9.4. ANTICORPOS E CONTROLO DA INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM*

A resposta humoral caracteriza-se pela activação de linfócitos B após contacto com o antigénio e com células T. Decorrente desta activação, os linfócitos B entram

num processo de proliferação e diferenciação celular, dando origem a plasmócitos (secretores de anticorpos ou Ig) e a linfócitos B de memória.

Numa segunda exposição a um mesmo antígeno, os linfócitos B de memória rapidamente se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos de elevada afinidade e especificidade. Após activação, os linfócitos B podem comutar o isotipo da Ig que expressam (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), por meio de processos de recombinação (deleção) de determinados segmentos de DNA ao nível da região constante das cadeias pesadas da Ig. Deste modo, podem-se alterar as propriedades efectoras dos anticorpos, mantendo a mesma especificidade para o antígeno (Murphy, 2012).

Embora o papel essencial da resposta imune mediada por células no controlo da infecção por *Cryptosporidium* no hospedeiro imunocompetente já tenha sido estabelecido (Theodos, 1998; McDonald, 2000), a contribuição relativa à resposta por anticorpos permanece pouco clara (Okhuysen *et al.*, 1998; Chappell *et al.*, 1999; Borad & Ward, 2010). Diversos estudos têm sido feitos em modelos animais de laboratório, gado doméstico e humanos, para determinar qual a importância da cinética, isotipos e especificidade para os antígenos na resposta por anticorpos no contexto da infecção por *Cryptosporidium* (Theodos, 1998; Leitch & He, 2012). A presença de anticorpos ao nível do soro e da mucosa intestinal tem-se mostrado coincidente com a resolução da infecção e da diarreia associada, o que é sugestivo de eventual contribuição para a resistência ou para a diminuição da gravidade da infecção por este parasita (Moss *et al.*, 1998; Chappell *et al.*, 1999; Frost *et al.*, 2005a).

O doseamento de anticorpos no soro, por ELISA, mostrou que a infecção por *Cryptosporidium* é acompanhada pela produção de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA, que diminuem após resolução da infecção, apesar da IgG no soro poder persistir por vários meses (Ungar *et al.*, 1986; Peeters *et al.*, 1992). Contudo, num outro estudo feito em humanos adultos, foi encontrada IgA secretória nas amostras fecais, mas não se detectaram IgG nem IgM. A IgA secretória, produzida pelo hospedeiro como resposta a uma infecção, possui uma importante função protectora da mucosa, de toxinas e agentes patogénicos. No contexto da infecção por *Cryptosporidium*, verificou-se que os seus níveis foram superiores em indivíduos que excretavam oocistos ou com diarreia (Dann *et al.*, 2000). Nos países com baixo-médio rendimento, como o Brasil, os níveis de IgG anti-*Cryptosporidium* no soro de crianças pode permanecer aumentado ao longo do

tempo, provavelmente devido à exposição contínua à infecção (Cox *et al.*, 2005); no entanto, foi descrita a diminuição dos níveis de IgA e de IgM em situações de diarreia persistente, em crianças no Bangladesh (Khan *et al.*, 2004).

A susceptibilidade aumentada à infecção, em pessoas com imunodeficiências primárias por deficit de anticorpos, tais como hipogamaglobulinémias, síndrome hiper-IgM e deficiência de IgA, não lhes permite debelar a infecção (Lasser *et al.*, 1979; Wolska-Kusnierz *et al.*, 2007). Verificou-se que os infectados por VIH e com criptosporidiose crónica, apresentavam elevados títulos de IgA secretória, que no entanto, não seriam suficientes para controlar a infecção por *Cryptosporidium*, sugestivo da necessidade de outros mecanismos de defesa adicionais (Cozon *et al.*, 1994).

A função protectora dos anticorpos continua a gerar opiniões contrárias. O estudo realizado por Frost *et al.* (2005b) sugere que a forte resposta serológica a um grupo de antígenos específicos (27-kDa) estaria associada com a redução do risco de diarreia sem perda de peso, num grupo de indivíduos infectados por VIH. Ainda no contexto da resposta serológica específica, Priest *et al.* (2006) efectuaram um estudo longitudinal em crianças peruanas com criptosporidiose, no qual descreveram que a resposta humoral aos antígenos 17/27-kDa foi superior nas crianças mais velhas, sugerindo haver uma relação com o número de infecções prévias.

A utilização de anticorpos recombinantes acoplados a moléculas associadas à imunidade inata tem vindo a ser testada recentemente, em modelos animais, como agentes terapêuticos, tendo-se observado uma forte redução no início da infecção por *Cryptosporidium* (Imboden *et al.*, 2010).

Dado que a resposta mediada por anticorpos sugere, por vezes, poder representar um mecanismo potencialmente significativo na resolução da infecção e da resistência ao parasita, ou somente, revelar-se como um marcador temporário da resposta à infecção (Riggs, 2002), são necessários mais estudos que demonstrem inequivocamente qual o papel da resposta por anticorpos na infecção por *Cryptosporidium*.

1.10. Referências

ABRAHAMSEN, M. S. 2001. *Cryptosporidium parvum* genome project. *Comp Funct Genomics*, 2, 19-21.

ABRAHAMSEN, M. S., TEMPLETON, T. J., ENOMOTO, S., ABRAHANTE, J. E., ZHU, G., LANCTO, C. A., DENG, M., LIU, C., WIDMER, G., TZIPORI, S., BUCK, G. A., XU, P., BANKIER, A. T., DEAR, P. H., KONFORTOV, B. A., SPRIGGS, H. F., IYER, L., ANANTHARAMAN, V., ARAVIND, L. & KAPUR, V. 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304, 441-5.

AGNAMEY, P., DJEDDI, D., OUKACHBI, Z., TOTET, A. & RACCURT, C. P. 2010. *Cryptosporidium hominis* and *Isospora belli* diarrhea in travelers returning from West Africa. *J Travel Med*, 17, 141-2.

AGUIRRE, S. A., MASON, P. H. & PERRYMAN, L. E. 1994. Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, 62, 697-9.

AJJAMPUR, S. S., SANKARAN, P. & KANG, G. 2008. *Cryptosporidium* species in HIV-infected individuals in India: an overview. *Natl Med J India*, 21, 178-84.

ALAM, N., WOJTYNIAK, B., HENRY, F. J. & RAHAMAN, M. M. 1989. Mothers' personal and domestic hygiene and diarrhoea incidence in young children in rural Bangladesh. *Int J Epidemiol*, 18, 242-7.

ALLES, A. J., WALDRON, M. A., SIERRA, L. S. & MATTIA, A. R. 1995. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *J Clin Microbiol*, 33, 1632-4.

ALVAREZ-PELLITERO, P., QUIROGA, M. I., SITJA-BOBADILLA, A., REDONDO, M. J., PALENZUELA, O., PADROS, F., VAZQUEZ, S. & NIETO, J. M. 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis Aquat Organ*, 62, 133-45.

ALVAREZ-PELLITERO, P. & SITJÀ-BOBADILLA, A. 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol*, 32, 1007-21.

ALVES, M., MATOS, O. & ANTUNES, F. 2001b. Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Ann Trop Med Parasitol*, 95, 627-32.

ALVES, M., MATOS, O., PEREIRA DA FONSECA, I., DELGADO, E., LOURENCO, A. M. & ANTUNES, F. 2001a. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human HIV-infected and animal hosts. *J Eukaryot Microbiol*, Suppl:17S-18S.

ALVES, M., MATOS, O., SPANO, F. & ANTUNES, F. 2000. PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. *Ann Trop Med Parasitol*, 94, 291-7.

ALVES, M., XIAO, L., SULAIMAN, I., LAL, A. A., MATOS, O. & ANTUNES, F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol*, 41, 2744-7.

AMOROS, I., ALONSO, J. L. & CUESTA, G. 2010. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *J Food Prot*, 73, 1138-40.

ANDERSON, D. R., DUSZYNSKI, D. W. & MARQUARDT, W. C. 1968. Three new coccidia (Protozoa: Telosporea) from kingsnakes, *Lampropeltis* spp., in Illinois, with a description of *Eimeria zamensi* Phisalix, 1921. *J Parasitol*, 54, 577-81.

ARGENZIO, R. A., LECCE, J. & POWELL, D. W. 1993. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. *Gastroenterology*, 104, 440-7.

ARMSON, A., THOMPSON, R. C. & REYNOLDS, J. A. 2003. A review of chemotherapeutic approaches to the treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1, 297-305.

ARROWOOD, M. J., HURD, M. R. & MEAD, J. R. 1995. A new method for evaluating experimental cryptosporidial parasite loads using immunofluorescent flow cytometry. *J Parasitol*, 81, 404-9.

ATHERTON, F., NEWMAN, C. P. & CASEMORE, D. P. 1995. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with a public water supply in the UK. *Epidemiol Infect*, 115, 123-31.

AURAY, G., LACROIX-LAMANDE, S., MANCASSOLA, R., DIMIER-POISSON, I. & LAURENT, F. 2007. Involvement of intestinal epithelial cells in dendritic cell recruitment during *C. parvum* infection. *Microbes Infect*, 9, 574-82.

BALDURSSON, S. & KARANIS, P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res*, 45, 6603-14.

BANDYOPADHYAY, K., KELLAR, K. L., MOURA, I., CASAQUI CAROLLO, M. C., GRACZYK, T. K., SLEMENDA, S., JOHNSTON, S. P. & DA SILVA, A. J. 2007. Rapid microsphere assay for identification of *Cryptosporidium*

hominis and *Cryptosporidium parvum* in stool and environmental samples. *J Clin Microbiol*, 45, 2835-40.

BARAKAT, F. M., MCDONALD, V., DI SANTO, J. P. & KORBEL, D. S. 2009b. Roles for NK cells and an NK cell-independent source of intestinal gamma interferon for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, 77, 5044-9.

BARAKAT, F. M., MCDONALD, V., FOSTER, G. R., TOVEY, M. G. & KORBEL, D. S. 2009a. *Cryptosporidium parvum* infection rapidly induces a protective innate immune response involving type I interferon. *J Infect Dis*, 200, 1548-55.

BARBOSA, J. M., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., RODRIGUES, A. G., HANSCHIED, T., SHAPIRO, H. & PINA-VAZ, C. 2008. A flow cytometric protocol for detection of *Cryptosporidium* spp. *Cytometry A*, 73, 44-7.

BARTA, J. R. & THOMPSON, R. C. A. 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol*, 22, 463-8.

BAXBY, D., BLUNDELL, N. & HART, C. A. 1984. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J Hyg (Lond)*, 93, 317-23.

BELKAID, Y. & TARBELL, K. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol*, 27, 551-89.

BENSON, C. A., KAPLAN, J. E., MASUR, H., PAU, A. & HOLMES, K. K. 2004. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*, 53, 1-112.

BETANCOURT, W. Q. & ROSE, J. B. 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol*, 126, 219-34.

BLANSHARD, C., JACKSON, A. M., SHANSON, D. C., FRANCIS, N. & GAZZARD, B. G. 1992. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Q J Med*, 85, 813-23.

BONNIN, A., FOURMAUX, M. N., DUBREMETZ, J. F., NELSON, R. G., GOBET, P., HARLY, G., BUISSON, M., PUYGAUTHIER-TOUBAS, D., GABRIEL-POSPISIL, G., NACIRI, M. & CAMERLYNCK, P. 1996. Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol Lett*, 137, 207-11.

BORAD, A. & WARD, H. 2010. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol*, 5, 507-19.

BOWDISH, D. M., DAVIDSON, D. J. & HANCOCK, R. E. 2006. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306, 27-66.

CACCIO, S., HOMAN, W., CAMILLI, R., TRALDI, G., KORTBEEK, T. & POZIO, E. 2000. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 120, 237-44.

CACCIO, S., HOMAN, W., VAN DIJK, K. & POZIO, E. 1999. Genetic polymorphism at the beta-tubulin locus among human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol Lett*, 170, 173-9.

CACCIO, S. M., THOMPSON, R. C., MCLAUCHLIN, J. & SMITH, H. V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*, 21, 430-7.

CALVO, M., CARAZO, M., ARIAS, M. L., CHAVES, C., MONGE, R. & CHINCHILLA, M. 2004. Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr*, 54, 428-32.

CAMA, V. A., ROSS, J. M., CRAWFORD, S., KAWAI, V., CHAVEZ-VALDEZ, R., VARGAS, D., VIVAR, A., TICONA, E., NAVINCOPA, M., WILLIAMSON, J., ORTEGA, Y., GILMAN, R. H., BERN, C. & XIAO, L. 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis*, 196, 684-91.

CAREY, C. M., LEE, H. & TREVORS, J. T. 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*, 38, 818-62.

CARRAWAY, M., TZIPORI, S. & WIDMER, G. 1996. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. *Appl Environ Microbiol*, 62, 712-6.

CARRENO, R. A., MATRIN, D. S. & BARTA, J. R. 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res*, 85, 899-904.

CASEMORE, D. P. 1990. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol Infect*, 104, 1-28.

CASEMORE, D. P. 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol*, 44, 445-51.

CASEMORE, D. P., ARMSTRONG, M. & SANDS, R. L. 1985b. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol*, 38, 1337-41.

CASEMORE, D. P., SANDS, R. L. & CURRY, A. 1985a. *Cryptosporidium* species a "new" human pathogen. *J Clin Pathol*, 38, 1321-36.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1982a. Human cryptosporidiosis-Alabama. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 31, 252-4.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1982b. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 31, 589-92.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1984. Cryptosporidiosis among children attending day-care centers-Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 33, 599-601.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1994. *Cryptosporidium* infections associated with swimming pools-Dane County, Wisconsin, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 43, 561-3.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1996. Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum*-Minnesota, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 45, 783-4.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1998. Outbreak of cryptosporidiosis associated with a water sprinkler fountain-Minnesota, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 47, 856-60.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2003. Surveillance data from swimming pool inspections-selected states and counties, United States, May-September 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 52, 513-6.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2010. Prevention & Control of Cryptosporidiosis. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/prevention.html>, acessado a 10 de Janeiro de 2013.

CERSOSIMO, E., WILKOWSKE, C. J., ROSENBLATT, J. E. & LUDWIG, J. 1992. Isolated antral narrowing associated with gastrointestinal cryptosporidiosis in acquired immunodeficiency syndrome. *Mayo Clin Proc*, 67, 553-6.

CHALMERS, R. M. & DAVIES, A. P. 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol*, 124, 138-46.

CHALMERS, R. M., STURDEE, A. P., BULL, S. A., MILLER, A. & WRIGHT, S. E. 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol Res*, 83, 478-82.

CHAPPELL, C. L., OKHUYSEN, P. C., STERLING, C. R. & DUPONT, H. L. 1996. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J Infect Dis*, 173, 232-6.

CHAPPELL, C. L., OKHUYSEN, P. C., STERLING, C. R., WANG, C., JAKUBOWSKI, W. & DUPONT, H. L. 1999. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am J Trop Med Hyg*, 60, 157-64.

CHEN, W., HARP, J. A., HARMSSEN, A. G. & HAVELL, E. A. 1993. Gamma interferon functions in resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun*, 61, 3548-51.

CHEN, X. M., KEITHLY, J. S., PAYA, C. V. & LARUSSO, N. F. 2002. Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*, 346, 1723-31.

COLFORD, J. M., JR., TAGER, I. B., HIROZAWA, A. M., LEMP, G. F., ARAGON, T. & PETERSEN, C. 1996. Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival. *Am J Epidemiol*, 144, 807-16.

CONN, D. B., WEAVER, J., TAMANG, L. & GRACZYK, T. K. 2007. Synanthropic flies as vectors of *Cryptosporidium* and *Giardia* among livestock and wildlife in a multispecies agricultural complex. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7, 643-51.

CORONA-VASQUEZ, B., SAMUELSON, A., RENNECKER, J. L. & MARINAS, B. J. 2002. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Water Res*, 36, 4053-63.

COX, M. J., ELWIN, K., MASSAD, E. & AZEVEDO, R. S. 2005. Age-specific seroprevalence to an immunodominant *Cryptosporidium* sporozoite antigen in a Brazilian population. *Epidemiol Infect*, 133, 951-6.

COZON, G., BIRON, F., JEANNIN, M., CANNELLA, D. & REVILLARD, J. P. 1994. Secretory IgA antibodies to *Cryptosporidium parvum* in AIDS patients with chronic cryptosporidiosis. *J Infect Dis*, 169, 696-9.

CURRENT, W. L. & GARCIA, L. S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, 4, 325-58.

CURRENT, W. L., REESE, N. C., ERNST, J. V., BAILEY, W. S., HEYMAN, M. B. & WEINSTEIN, W. M. 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N Engl J Med*, 308, 1252-7.

CURRENT, W. L., UPTON, S. J. & HAYNES, T. B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool*, 33, 289-96.

- D'ANTONIO, R. G., WINN, R. E., TAYLOR, J. P., GUSTAFSON, T. L., CURRENT, W. L., RHODES, M. M., GARY, G. W., JR. & ZAJAC, R. A. 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann Intern Med*, 103, 886-8.
- DAI, X. & BOLL, J. 2003. Evaluation of attachment of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to soil particles. *J Environ Qual*, 32, 296-304.
- DANN, S. M., OKHUYSEN, P. C., SALAMEH, B. M., DUPONT, H. L. & CHAPPELL, C. L. 2000. Fecal antibodies to *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *Infect Immun*, 68, 5068-74.
- DATTA, S. C. & OPP, M. R. 2008. Lipopolysaccharide-induced increases in cytokines in discrete mouse brain regions are detectable using Luminex xMAP technology. *J Neurosci Methods*, 175, 119-24.
- DAWSON, D. 2005. Foodborne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol*, 103, 207-27.
- DE GRAAF, D. C., VANOPDENBOSCH, E., ORTEGA-MORA, L. M., ABBASSI, H. & PEETERS, J. E. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*, 29, 1269-87.
- DE WIT, M. A., KOOPMANS, M. P., KORTBEEK, L. M., VAN LEEUWEN, N. J., BARTELDS, A. I. & VAN DUYNHOVEN, Y. T. 2001. Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 7, 82-91.
- DELGADO, E., FONSECA, I. P., FAZENDEIRO, I., MATOS, O., ANTUNES, F. & CUNHA, M. B. 2003. *Cryptosporidium* spp. in ruminants at the Lisbon Zoo. *J Zoo Wildl Med*, 34, 352-6.

DENG, M. Q. & CLIVER, D. O. 1998. Differentiation of *Cryptosporidium parvum* isolates by a simplified randomly amplified polymorphic DNA technique. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1954-7.

DENG, M. Q. & CLIVER, D. O. 1999. Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitol Res*, 85, 733-6.

DENHOLM, K. M., HAITJEMA, H., GWYNNE, B. J., MORGAN, U. M. & IRWIN, P. J. 2001. Concurrent *Cryptosporidium* and parvovirus infections in a puppy. *Aust Vet J*, 79, 98-101.

DIETZ, V., VUGIA, D., NELSON, R., WICKLUND, J., NADLE, J., MCCOMBS, K. G. & REDDY, S. 2000. Active, multisite, laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg*, 62, 368-72.

DILLINGHAM, R. A., LIMA, A. A. & GUERRANT, R. L. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect*, 4, 1059-66.

DRYJANSKI, J., GOLD, J. W., RITCHIE, M. T., KURTZ, R. C., LIM, S. L. & ARMSTRONG, D. 1986. Cryptosporidiosis. Case report in a health team worker. *Am J Med*, 80, 751-2.

DUNBAR, S. A. 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta*, 363, 71-82.

EGOROV, A., FROST, F., MULLER, T., NAUMOVA, E., TERESCHENKO, A. & FORD, T. 2004. Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in a Russian city and evaluation of risk factors for infections. *Ann Epidemiol*, 14, 129-36.

EGYED, Z., SRETER, T., SZELL, Z., BESZTERI, B., DOBOS-KOVACS, M., MARIALIGETI, K., CORNELISSEN, A. W. & VARGA, I. 2002. Polyphasic typing of

Cryptosporidium baileyi: a suggested model for characterization of cryptosporidia. *J Parasitol*, 88, 237-43.

EGYED, Z., SRETER, T., SZELL, Z. & VARGA, I. 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp.-recent developments and future needs. *Vet Parasitol*, 111, 103-14.

EHIGIATOR, H. N., MCNAIR, N. & MEAD, J. R. 2007. *Cryptosporidium parvum*: the contribution of Th₁-inducing pathways to the resolution of infection in mice. *Exp Parasitol*, 115, 107-13.

EISENBERG, J. N., SETO, E. Y., COLFORD, J. M., JR., OLIVIERI, A. & SPEAR, R. C. 1998. An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. *Epidemiology*, 9, 255-63.

EL-GHAYSH, A. & BARRETT, J. 1999. Isoenzyme activities of different strains of *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol*, 81, 195-200.

ELSSER, K. A., MORICZ, M. & PROCTOR, E. M. 1986. *Cryptosporidium* infections: a laboratory survey. *CMAJ*, 135, 211-3.

ENRIQUEZ, F. J. & STERLING, C. R. 1993. Role of CD4⁺ TH₁- and TH₂-cell-secreted cytokines in cryptosporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)*, 40, 307-11.

EVANS, M. R. & GARDNER, D. 1996. Cryptosporidiosis outbreak associated with an educational farm holiday. *Commun Dis Rep CDR Rev*, 6, R50-1.

FAYER, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*, 126, 37-56.

FAYER, R. 2008. General Biology. In: FAYER, R. & XIAO, L. (eds.) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2ed. FL: CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, pp.1-42.

FAYER, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*, 124, 90-7.

FAYER, R., DUBEY, J. P. & LINDSAY, D. S. 2004. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol*, 20, 531-6.

FAYER, R., MORGAN, U. & UPTON, S. J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*, 30, 1305-22.

FAYER, R. & NERAD, T. 1996. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol*, 62, 1431-3.

FAYER, R., SANTIN, M. & TROUT, J. M. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet Parasitol*, 145, 260-6.

FAYER, R., SANTIN, M., TROUT, J. M. & GREINER, E. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol*, 135, 105-12.

FAYER, R., SANTIN, M. & XIAO, L. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol*, 91, 624-9.

FAYER, R., TROUT, J. & NERAD, T. 1996. Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Eukaryot Microbiol*, 43, 64S.

FAYER, R., TROUT, J. M., LEWIS, E. J., SANTIN, M., ZHOU, L., LAL, A. A. & XIAO, L. 2003. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol Res*, 89, 141-5.

FAYER, R., TROUT, J. M., XIAO, L., MORGAN, U. M., LAI, A. A. & DUBEY, J. P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol*, 87, 1415-22.

FENG, H., NIE, W., BONILLA, R., WIDMER, G., SHEORAN, A. & TZIPORI, S. 2006. Quantitative tracking of *Cryptosporidium* infection in cell culture with CFSE. *J Parasitol*, 92, 1350-4.

FENG, Y., WANG, L., DUAN, L., GOMEZ-PUERTA, L. A., ZHANG, L., ZHAO, X., HU, J., ZHANG, N. & XIAO, L. 2012. Extended outbreak of cryptosporidiosis in a pediatric hospital, China. *Emerg Infect Dis*, 18, 312-4.

FLANIGAN, T., WHALEN, C., TURNER, J., SOAVE, R., TOERNER, J., HAVLIR, D. & KOTLER, D. 1992. *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Ann Intern Med*, 116, 840-2.

FOUDRAINE, N. A., WEVERLING, G. J., VAN GOOL, T., ROOS, M. T., DE WOLF, F., KOOPMANS, P. P., VAN DEN BROEK, P. J., MEENHORST, P. L., VAN LEEUWEN, R., LANGE, J. M. & REISS, P. 1998. Improvement of chronic diarrhoea in patients with advanced HIV-1 infection during potent antiretroviral therapy. *AIDS*, 12, 35-41.

FOX, L. M. & SARAVOLATZ, L. D. 2005. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis*, 40, 1173-80.

FOXMAN, B. & RILEY, L. 2001. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol*, 153, 1135-41.

FREIRE-SANTOS, F., OTEIZA-LOPEZ, A. M., VERGARA-CASTIBLANCO, C. A., ARES-MAZAS, E., ALVAREZ-SUAREZ, E. & GARCIA-MARTIN, O. 2000. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *J Parasitol*, 86, 853-4.

FROST, F. J., FEA, E., GILLI, G., BIORCI, F., MULLER, T. M., CRAUN, G. F. & CALDERON, R. L. 2000c. Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in southern Europe. *Eur J Epidemiol*, 16, 385-90.

FROST, F. J., MULLER, T., CRAUN, G. F., FRASER, D., THOMPSON, D., NOTENBOOM, R. & CALDERON, R. L. 2000a. Serological analysis of a cryptosporidiosis epidemic. *Int J Epidemiol*, 29, 376-9.

FROST, F. J., MULLER, T., CRAUN, G. F., LOCKWOOD, W. B. & CALDERON, R. L. 2002. Serological evidence of endemic waterborne *Cryptosporidium* infections. *Ann Epidemiol*, 12, 222-7.

FROST, F. J., MULLER, T. B., CALDERON, R. L. & CRAUN, G. F. 2004. Analysis of serological responses to *Cryptosporidium* antigen among NHANES III participants. *Ann Epidemiol*, 14, 473-8.

FROST, F. J., MULLER, T. B., FAIRLEY, C. K., HURLEY, J. S., CRAUN, G. F. & CALDERON, R. L. 2000b. Serological evaluation of *Cryptosporidium* oocyst findings in the water supply for Sydney, Australia. *Int J Environ Health Res*, 10, 35-40.

FROST, F. J., ROBERTS, M., KUNDE, T. R., CRAUN, G., TOLLESTRUP, K., HARTER, L. & MULLER, T. 2005a. How clean must our drinking water be: the importance of protective immunity. *J Infect Dis*, 191, 809-14.

FROST, F. J., TOLLESTRUP, K., CRAUN, G. F., FAIRLEY, C. K., SINCLAIR, M. I. & KUNDE, T. R. 2005b. Protective immunity associated with a

strong serological response to a *Cryptosporidium*-specific antigen group, in HIV-infected individuals. *J Infect Dis*, 192, 618-21.

GAIT, R., SOUTAR, R. H., HANSON, M., FRASER, C. & CHALMERS, R. 2008. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Vet Rec*, 162, 843-5.

GARGALA, G., LE GOFF, L., BALLEST, J. J., FAVENNEC, L., STACHULSKI, A. V. & ROSSIGNOL, J. F. 2010. Evaluation of new thiazolide/thiadiazolide derivatives reveals nitro group-independent efficacy against in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 1315-8.

GARONE, M. A., WINSTON, B. J. & LEWIS, J. H. 1986. Cryptosporidiosis of the stomach. *Am J Gastroenterol*, 81, 465-70.

GATEI, W., WAMAE, C. N., MBAE, C., WARURU, A., MULINGE, E., WAITHERA, T., GATIKA, S. M., KAMWATI, S. K., REVATHI, G. & HART, C. A. 2006. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 78-82.

GELLETLIE, R., STUART, J., SOLTANPOOR, N., ARMSTRONG, R. & NICHOLS, G. 1997. Cryptosporidiosis associated with school milk. *Lancet*, 350, 1005-6.

GENTILE, G., VENDITTI, M., MICOZZI, A., CAPRIOLI, A., DONELLI, G., TIRINDELLI, C., MELONI, G., ARCESE, W. & MARTINO, P. 1991. Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. *Rev Infect Dis*, 13, 842-6.

GIBBONS, C. L., GAZZARD, B. G., IBRAHIM, M. A. A., MORRIS-JONES, S., ONG, C. S. L. & AWAD-EL-KARIEM, F. M. 1998. Correlation between markers of strain variation in *Cryptosporidium parvum*: Evidence of clonality. *Parasitol Int*, 47, 139-47.

GLABERMAN, S., MOORE, J. E., LOWERY, C. J., CHALMERS, R. M., SULAIMAN, I., ELWIN, K., ROONEY, P. J., MILLAR, B. C., DOOLEY, J. S., LAL, A. A. & XIAO, L. 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis*, 8, 631-3.

GLAESER, C., GRIMM, F., MATHIS, A., WEBER, R., NADAL, D. & DEPLAZES, P. 2004. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from diarrheic children in Switzerland. *Pediatr Infect Dis J*, 23, 359-61.

GLASER, C. A., SAFRIN, S., REINGOLD, A. & NEWMAN, T. B. 1998. Association between *Cryptosporidium* infection and animal exposure in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 17, 79-82.

GOBET, P. & TOZE, S. 2001. Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *FEMS Microbiol Lett*, 200, 37-41.

GODWIN, T. A. 1991. Cryptosporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome: a study of 15 autopsy cases. *Hum Pathol*, 22, 1215-24.

GOH, S., REACHER, M., CASEMORE, D. P., VERLANDER, N. Q., CHALMERS, R., KNOWLES, M., WILLIAMS, J., OSBORN, K. & RICHARDS, S. 2004. Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. *Emerg Infect Dis*, 10, 1007-15.

GOMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L. M., TABARES, E., LOPEZ-RODAS, V. & COSTAS, E. 2000. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol*, 66, 1866-70.

GOMEZ-COUSO, H., FREIRE-SANTOS, F., MARTINEZ-URTAZA, J., GARCIA-MARTIN, O. & ARES-MAZAS, M. E. 2003. Contamination of bivalve

molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *Int J Food Microbiol*, 87, 97-105.

GOMEZ MORALES, M. A., LA ROSA, G., LUDOVISI, A., ONORI, A. M. & POZIO, E. 1999. Cytokine profile induced by *Cryptosporidium* antigen in peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent and immunosuppressed persons with cryptosporidiosis. *J Infect Dis*, 179, 967-73.

GOMEZ MORALES, M. A., MELE, R., LUDOVISI, A., BRUSCHI, F., TOSINI, F., RIGANO, R. & POZIO, E. 2004. *Cryptosporidium parvum*-specific CD4 Th₁ cells from sensitized donors responding to both fractionated and recombinant antigenic proteins. *Infect Immun*, 72, 1306-10.

GOMEZ MORALES, M. A. & POZIO, E. 2002. Humoral and cellular immunity against *Cryptosporidium* infection. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2, 291-301.

GOMEZ, M. S., TORRES, J., GRACENEA, M., FERNANDEZ-MORAN, J. & GONZALEZ-MORENO, O. 2000. Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona zoo mammals. *Parasitol Res*, 86, 318-23.

GOMEZ, M. S., VILA, T., FELIU, C., MONTOLIU, I., GRACENEA, M. & FERNANDEZ, J. 1996. A survey for *Cryptosporidium* spp. in mammals at the Barcelona Zoo. *Int J Parasitol*, 26, 1331-3.

GOODWIN, M. A., LATIMER, K. S., BROWN, J., STEFFENS, W. L., MARTIN, P. W., RESURRECCION, R. S., SMELTZER, M. A. & DICKSON, T. G. 1988. Respiratory cryptosporidiosis in chickens. *Poult Sci*, 67, 1684-93.

GOOKIN, J. L., CHIANG, S., ALLEN, J., ARMSTRONG, M. U., STAUFFER, S. H., FINNEGAN, C. & MURTAUGH, M. P. 2006. NF-kappaB-mediated expression

of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G164-74.

GOOKIN, J. L., NORDONE, S. K. & ARGENZIO, R. A. 2002. Host responses to *Cryptosporidium* infection. *J Vet Intern Med*, 16, 12-21.

GRACZYK, T. K., CONN, D. B., LUCY, F., MINCHIN, D., TAMANG, L., MOURA, L. N. & DASILVA, A. J. 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol Res*, 93, 385-91.

GRACZYK, T. K., CRANFIELD, M. R., FAYER, R. & BIXLER, H. 1999b. House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg*, 61, 500-4.

GRACZYK, T. K., FAYER, R., LEWIS, E. J., TROUT, J. M. & FARLEY, C. A. 1999a. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol Res*, 85, 518-21.

GRIFFIN, K., MATTHAI, E., HOMMEL, M., WEITZ, J. C., BAXBY, D. & HART, C. A. 1992. Antigenic diversity among oocysts of clinical isolates of *Cryptosporidium parvum*. *J Protozool Res*, 2, 97-101.

GRIFFIN, S. M., CHEN, I. M., FOUT, G. S., WADE, T. J. & EGOROV, A. I. 2011. Development of a multiplex microsphere immunoassay for the quantitation of salivary antibody responses to selected waterborne pathogens. *J Immunol Methods*, 364, 83-93.

GUARINO, A., CANANI, R. B., CASOLA, A., POZIO, E., RUSSO, R., BRUZZESE, E., FONTANA, M. & RUBINO, A. 1995. Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J Infect Dis*, 171, 976-83.

GUARINO, A., CASTALDO, A., RUSSO, S., SPAGNUOLO, M. I., CANANI, R. B., TARALLO, L., DIBENEDETTO, L. & RUBINO, A. 1997. Enteric cryptosporidiosis in pediatric HIV infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 25, 182-7.

GUERRANT, R. L. 1997. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg Infect Dis*, 3, 51-7.

GUERRANT, R. L., KOSEK, M., MOORE, S., LORNTZ, B., BRANTLEY, R. & LIMA, A. A. 2002. Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch Med Res*, 33, 351-5.

HARPER, C. M., COWELL, N. A., ADAMS, B. C., LANGLEY, A. J. & WOHLSEN, T. D. 2002. Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Commun Dis Intell*, 26, 449-50.

HARRIS, J. R. & PETRY, F. 1999. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *J Parasitol*, 85, 839-49.

HAYWARD, A. R., LEVY, J., FACCHETTI, F., NOTARANGELO, L., OCHS, H. D., ETZIONI, A., BONNEFOY, J. Y., COSYNS, M. & WEINBERG, A. 1997. Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *J Immunol*, 158, 977-83.

HEINE, J., MOON, H. W. & WOODMANSEE, D. B. 1984. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect Immun*, 43, 856-9.

HELLARD, M., HOCKING, J., WILLIS, J., DORE, G. & FAIRLEY, C. 2003. Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men. *Sex Transm Infect*, 79, 412-4.

HENRIKSEN, S. A. & POHLENZ, J. F. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand*, 22, 594-6.

HEWITT, R. G., YIANNOUTSOS, C. T., HIGGS, E. S., CAREY, J. T., GEISELER, P. J., SOAVE, R., ROSENBERG, R., VAZQUEZ, G. J., WHEAT, L. J., FASS, R. J., ANTONINIEVIC, Z., WALAWANDER, A. L., FLANIGAN, T. P. & BENDER, J. F. 2000. Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trial Group. *Clin Infect Dis*, 31, 1084-92.

HEYMAN, M. B., SHIGEKUNI, L. K. & AMMANN, A. J. 1986. Separation of *Cryptosporidium* oocysts from fecal debris by density gradient centrifugation and glass bead columns. *J Clin Microbiol*, 23, 789-91.

HIJJAWI, N. S., MELONI, B. P., RYAN, U. M., OLSON, M. E. & THOMPSON, R. C. A. 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*, 32, 1719-26.

HLAVSA, M. C., WATSON, J. C. & BEACH, M. J. 2005. Cryptosporidiosis surveillance-United States 1999-2002. *MMWR Surveill Summ*, 54, 1-8.

HOMMER, V., EICHHOLZ, J. & PETRY, F. 2003. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *J Antimicrob Chemother*, 52, 359-64.

HORMAN, A., KORPELA, H., SUTINEN, J., WEDEL, H. & HANNINEN, M. L. 2004. Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *Int J Parasitol*, 34, 1337-46.

HSU, B. M., WU, N. M., JANG, H. D., SHIH, F. C., WAN, M. T. & KUNG, C. M. 2005. Using the flow cytometry to quantify the *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Environ Monit Assess*, 104, 155-62.

HUANG, K. & YANG, S. 2002. Inhibitory effect of selenium on *Cryptosporidium parvum* infection in vitro and in vivo. *Biol Trace Elem Res*, 90, 261-72.

HUFFMAN, D. E., SLIFKO, T. R., SALISBURY, K. & ROSE, J. B. 2000. Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Res*, 34, 2491-98.

HUNTER, P. R., HUGHES, S., WOODHOUSE, S., SYED, Q., VERLANDER, N. Q., CHALMERS, R. M., MORGAN, K., NICHOLS, G., BEECHING, N. & OSBORN, K. 2004. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerg Infect Dis*, 10, 1241-9.

HUNTER, P. R. & NICHOLS, G. 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, 15, 145-54.

HUNTER, P. R. & THOMPSON, R. C. 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*, 35, 1181-90.

IMBODEN, M., RIGGS, M. W., SCHAEFER, D. A., HOMAN, E. J. & BREMEL, R. D. 2010. Antibodies fused to innate immune molecules reduce initiation of *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 1385-92.

ISEKI, M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn J Parasitol*, 28, 285-307.

JAROSZESKI, M. J. & RADCLIFF, G. 1999. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*, 11, 37-53.

JENKINS, M. B., BOWMAN, D. D. & GHORSE, W. C. 1998. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Appl Environ Microbiol*, 64, 784-8.

JEX, A. R., SMITH, H. V., MONIS, P. T., CAMPBELL, B. E. & GASSER, R. B. 2008. *Cryptosporidium* - biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv*, 26, 304-17.

JIANG, J. & XIAO, L. 2003. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *J Eukaryot Microbiol*, 50 Suppl, 542-7.

JOHNSON, J., BUDDLE, R., REID, S., ARMSON, A. & RYAN, U. M. 2008a. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Exp Parasitol*, 119, 418-21.

JOHNSON, W. D., DIAZ, R. M., FLANDERS, W. D., GOODMAN, M., HILL, A. N., HOLTGRAVE, D., MALOW, R. & MCCLELLAN, W. M. 2008b. Behavioral interventions to reduce risk for sexual transmission of HIV among men who have sex with men. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001230.

JURANEK, D. D. 1995. Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clin Infect Dis*, 21 Suppl 1, S57-61.

KALIA, V., SARKAR, S., GOURLEY, T. S., ROUSE, B. T. & AHMED, R. 2006. Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol*, 18, 255-64.

KAMINJOLO, J. S., ADESIYUN, A. A., LOREGNARD, R. & KITSON-PIGGOTT, W. 1993. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in livestock in Trinidad and Tobago. *Vet Parasitol*, 45, 209-13.

KHAN, W. A., ROGERS, K. A., KARIM, M. M., AHMED, S., HIBBERD, P. L., CALDERWOOD, S. B., RYAN, E. T. & WARD, H. D. 2004. Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. *Am J Trop Med Hyg*, 71, 412-9.

KIANG, K. M., SCHEFTEL, J. M., LEANO, F. T., TAYLOR, C. M., BELLE-ISLE, P. A., CEBELINSKI, E. A., DANILA, R. & SMITH, K. E. 2006. Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003. *Epidemiol Infect*, 134, 878-86.

KLEIN, P., CIRIONI, O., GIACOMETTI, A. & SCALISE, G. 2008. In vitro and in vivo activity of aurintricarboxylic acid preparations against *Cryptosporidium parvum*. *J Antimicrob Chemother*, 62, 1101-4.

KOCH, K. L., PHILLIPS, D. J., ABER, R. C. & CURRENT, W. L. 1985. Cryptosporidiosis in hospital personnel. Evidence for person-to-person transmission. *Ann Intern Med*, 102, 593-6.

KORICH, D. G., MEAD, J. R., MADORE, M. S., SINCLAIR, N. A. & STERLING, C. R. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol*, 56, 1423-8.

KOSEK, M., ALCANTARA, C., LIMA, A. A. & GUERRANT, R. L. 2001. Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Infect Dis*, 1, 262-9.

KOUDELA, B. & MODRÝ, D. 1998. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitol (Praha)*, 45, 93-100.

KOZISEK, F., CRAUN, G. F., CEROVSKA, L., PUMANN, P., FROST, F. & MULLER, T. 2008. Serological responses to *Cryptosporidium*-specific antigens in Czech populations with different water sources. *Epidemiol Infect*, 136, 279-86.

KUHLS, T. L., MOSIER, D. A., CRAWFORD, D. L. & GRIFFIS, J. 1994. Seroprevalence of cryptosporidial antibodies during infancy, childhood, and adolescence. *Clin Infect Dis*, 18, 731-5.

KUTUKCULER, N., MORATTO, D., AYDINOK, Y., LOUGARIS, V., AKSOYLAR, S., PLEBANI, A., GENEL, F. & NOTARANGELO, L. D. 2003. Disseminated *Cryptosporidium* infection in an infant with hyper-IgM syndrome caused by CD40 deficiency. *J Pediatr*, 142, 194-6.

LACROIX-LAMANDE, S., MANCASSOLA, R., NACIRI, M. & LAURENT, F. 2002. Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, 70, 2090-9.

LASSER, K. H., LEWIN, K. J. & RYNING, F. W. 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum Pathol*, 10, 234-40.

LAURENT, F., ECKMANN, L., SAVIDGE, T. C., MORGAN, G., THEODOS, C., NACIRI, M. & KAGNOFF, M. F. 1997. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect Immun*, 65, 5067-73.

LAZENSKY, R., HAMMOND, R. M., VAN ZILE, K. & GEIB, K. 2008. Cryptosporidiosis outbreak in a Nassau County, Florida, return travel group from Ireland, May 24, 2006-June 4, 2006. *J Environ Health*, 71, 20-4, 44-5.

LEAN, I. S., LACROIX-LAMANDE, S., LAURENT, F. & MCDONALD, V. 2006. Role of tumor necrosis factor alpha in development of immunity against *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, 74, 4379-82.

LEAN, I. S., MCDONALD, S. A., BAJAJ-ELLIOTT, M., POLLOK, R. C., FARTHING, M. J. & MCDONALD, V. 2003. Interleukin-4 and transforming growth factor beta have opposing regulatory effects on gamma interferon-mediated inhibition of *Cryptosporidium parvum* reproduction. *Infect Immun*, 71, 4580-5.

LEAN, I. S., MCDONALD, V. & POLLOK, R. C. 2002. The role of cytokines in the pathogenesis of *Cryptosporidium* infection. *Curr Opin Infect Dis*, 15, 229-34.

LEAV, B. A., MACKAY, M. & WARD, H. D. 2003. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clin Infect Dis*, 36, 903-8.

LEITCH, G. J. & HE, Q. 1999. Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model. *Infect Immun*, 67, 5885-91.

LEITCH, G. J. & HE, Q. 2012. Cryptosporidiosis-an overview. *J Biomed Res*, 25, 1-16.

LEONI, F., GALLIMORE, C. I., GREEN, J. & MCLAUCHLIN, J. 2006. Characterisation of small double stranded RNA molecule in *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Parasitol Int*, 55, 299-306.

LEVINE, N. D. 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol*, 66, 830-4.

LEVINE, N. D. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). *J Protozool*, 31, 94-8.

LI, W., ZHANG, N., GONG, P., CAO, L., LI, J., SU, L., LI, S., DIAO, Y., WU, K., LI, H. & ZHANG, X. 2010. A novel multiplex PCR coupled with Luminex assay for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. *Vet Parasitol*, 173, 11-8.

LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L., SUNDERMANN, C. A. & GIAMBRONE, J. J. 1988. Effect of broiler chicken age on susceptibility to experimentally induced *Cryptosporidium baileyi* infection. *Am J Vet Res*, 49, 1412-4.

LINDSAY, D. S., UPTON, S. J., OWENS, D. S., MORGAN, U. M., MEAD, J. R. & BLAGBURN, B. L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol*, 47, 91-5.

LOBO, M. L., XIAO, L., ANTUNES, F. & MATOS, O. 2009. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Lett Appl Microbiol*, 48, 732-7.

LOPEZ-VELEZ, R., TARAZONA, R., GARCIA CAMACHO, A., GOMEZ-MAMPASO, E., GUERRERO, A., MOREIRA, V. & VILLANUEVA, R. 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14, 677-81.

LOURENÇO, A. M., SOUSA, C. B. D., MATOS, O., ALVES, M., PEREIRA DA FONSECA, I. & ANTUNES, F. 2000. Estudo preliminar da criptosporidiose em gamos (*Dama dama* L.) da Tapada Nacional de Mafra (Portugal). *Acta Parasitol*, 7, 29-31.

LOWERY, C. J., NUGENT, P., MOORE, J. E., MILLAR, B. C., XIRU, X. & DOOLEY, J. S. 2001. PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiol Infect*, 127, 545-53.

LUCIO-FORSTER, A., GRIFFITHS, J. K., CAMA, V. A., XIAO, L. & BOWMAN, D. D. 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends Parasitol*, 26, 174-9.

LUMB, R., SMITH, K., O'DONOGHUE, P. J. & LANSER, J. A. 1988. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol Res*, 74, 531-6.

MA, P. & SOAVE, R. 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis*, 147, 824-8.

MAC KENZIE, W. R., HOXIE, N. J., PROCTOR, M. E., GRADUS, M. S., BLAIR, K. A., PETERSON, D. E., KAZMIERCZAK, J. J., ADDISS, D. G., FOX, K. R., ROSE, J. B. & DAVIS, J. P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*, 331, 161-7.

MACFARLANE, D. E. & HORNER-BRYCE, J. 1987. Cryptosporidiosis in well-nourished and malnourished children. *Acta Paediatr Scand*, 76, 474-7.

MADORE, M. S., ROSE, J. B., GERBA, C. P., ARROWOOD, M. J. & STERLING, C. R. 1987. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *J Parasitol*, 73, 702-5.

MALOY, K. J. & POWRIE, F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*, 2, 816-22.

MATOS, O. 2008. Zoo and wild mammals. In: FAYER, R. & XIAO, L. (eds.) *Cryptosporidium* and Criptosporidiosis. 2ed. FL: CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, pp.419-36.

MATOS, O., ALVES, M., XIAO, L., CAMA, V. & ANTUNES, F. 2004. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 10, 2256-7.

MATOS, O., TOMAS, A., AGUIAR, P., CASEMORE, D. & ANTUNES, F. 1998. Prevalence of cryptosporidiosis in AIDS patients with diarrhoea in Santa Maria Hospital, Lisbon. *Folia Parasitol (Praha)*, 45, 163-6.

MCDONALD, S. A., O'GRADY, J. E., BAJAJ-ELLIOTT, M., NOTLEY, C. A., ALEXANDER, J., BROMBACHER, F. & MCDONALD, V. 2004. Protection against the early acute phase of *Cryptosporidium parvum* infection conferred by interleukin-4-induced expression of T helper 1 cytokines. *J Infect Dis*, 190, 1019-25.

MCDONALD, V. 2000. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol*, 22, 597-604.

MCDONALD, V. 2008. Immune responses. In: FAYER, R. & XIAO, L. (eds.) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2ed. FL: CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, pp.209-33.

MCDONALD, V. & BANCROFT, G. J. 1994. Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Parasite Immunol*, 16, 315-20.

MCDONALD, V., DEER, R., UNI, S., ISEKI, M. & BANCROFT, G. J. 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect Immun*, 60, 3325-31.

MCDONALD, V., POLLOK, R. C., DHALIWAL, W., NAIK, S., FARTHING, M. J. & BAJAJ-ELLIOTT, M. 2006. A potential role for interleukin-18 in inhibition of the development of *Cryptosporidium parvum*. *Clin Exp Immunol*, 145, 555-62.

MCLAUCHLIN, J., PEDRAZA-DIAZ, S., AMAR-HOETZENEDER, C. & NICHOLS, G. L. 1999. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol*, 37, 3153-8.

MEINHARDT, P. L., CASEMORE, D. P. & MILLER, K. B. 1996. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiol Rev*, 18, 118-36.

MEISEL, J. L., PERERA, D. R., MELIGRO, C. & RUBIN, C. E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70, 1156-60.

MELINCEANU, L., SARAFOLEANU, C., LERESCU, L., TUCUREANU, C., CARAS, I. & SALAGEANU, A. 2009. Impact of smoking on the immunological profile of patients with laryngeal carcinoma. *J Med Life*, 2, 211-8.

MELO CRISTINO, J. A., CARVALHO, M. I. & SALGADO, M. J. 1988. An outbreak of cryptosporidiosis in a hospital day-care centre. *Epidemiol Infect*, 101, 355-9.

MELO, P. C., TEODOSIO, J., REIS, J., DUARTE, A., COSTA, J. C. & FONSECA, I. P. 2006. *Cryptosporidium* spp. in freshwater bivalves in Portugal. *J Eukaryot Microbiol*, 53 Suppl 1, S28-9.

MILLARD, P. S., GENSHEIMER, K. F., ADDISS, D. G., SOSIN, D. M., BECKETT, G. A., HOUCK-JANKOSKI, A. & HUDSON, A. 1994. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA*, 272, 1592-6.

MOLBAK, K., ANDERSEN, M., AABY, P., HOJLYNG, N., JAKOBSEN, M., SODEMANN, M. & DA SILVA, A. P. 1997. *Cryptosporidium* infection in infancy as a

cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, west Africa. *Am J Clin Nutr*, 65, 149-52.

MORGAN-RYAN, U. M., FALL, A., WARD, L. A., HIJAWI, N., SULAIMAN, I., FAYER, R., THOMPSON, R. C., OLSON, M., LAL, A. & XIAO, L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol*, 49, 433-40.

MORGAN, U. M., CONSTANTINE, C. C., O'DONOGHUE, P., MELONI, B. P., O'BRIEN, P. A. & THOMPSON, R. C. 1995. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 52, 559-64.

MORGAN, U. M., DEPLAZES, P., FORBES, D. A., SPANO, F., HERTZBERG, H., SARGENT, K. D., ELLIOT, A. & THOMPSON, R. C. 1999. Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitology*, 118, 49-58.

MOSS, D. M., CHAPPELL, C. L., OKHUYSEN, P. C., DUPONT, H. L., ARROWOOD, M. J., HIGHTOWER, A. W. & LAMMIE, P. J. 1998. The antibody response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infection in humans. *J Infect Dis*, 178, 827-33.

MTAMBO, M. M., SEBATWALE, J. B., KAMBARAGE, D. M., MUHAIRWA, A. P., MAEDA, G. E., KUSILUKA, L. J. & KAZWALA, R. R. 1997. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. *Prev Vet Med*, 31, 185-90.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.

MURPHY, K. 2012. Janeway's immunobiology. 8ed. NY: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

NATHAN, C. & SHILOH, M. U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8841-8.

NEWMAN, R. D., SEARS, C. L., MOORE, S. R., NATARO, J. P., WUHIB, T., AGNEW, D. A., GUERRANT, R. L. & LIMA, A. A. 1999. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, 180, 167-75.

NEWMAN, R. D., ZU, S. X., WUHIB, T., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. & SEARS, C. L. 1994. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Ann Intern Med*, 120, 500-5.

NICHOLS, G. 2008. Epidemiology. In: FAYER, R. & XIAO, L. (eds.) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2ed. FL: CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, pp.79-118.

NICHOLS, G. L., MCLAUCHLIN, J. & SAMUEL, D. 1991. A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. *J Protozool*, 38, 237S-240S.

NIME, F. A., BUREK, J. D., PAGE, D. L., HOLSCHEER, M. A. & YARDLEY, J. H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70, 592-8.

NINA, J. M., MCDONALD, V., DEER, R. M., WRIGHT, S. E., DYSON, D. A., CHIODINI, P. L. & MCADAM, K. P. 1992. Comparative study of the antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts. *Parasite Immunol*, 14, 227-32.

O'DONOGHUE, P. J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol*, 25, 139-95.

OGUNKOLADE, B. W., ROBINSON, H. A., MCDONALD, V., WEBSTER, K. & EVANS, D. A. 1993. Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. *Parasitol Res*, 79, 385-8.

OKHUYSEN, P. C. 2001. Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clin Infect Dis*, 33, 110-4.

OKHUYSEN, P. C., CHAPPELL, C. L., CRABB, J. H., STERLING, C. R. & DUPONT, H. L. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis*, 180, 1275-81.

OKHUYSEN, P. C., CHAPPELL, C. L., STERLING, C. R., JAKUBOWSKI, W. & DUPONT, H. L. 1998. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun*, 66, 441-3.

OLSON, M. E., GOH, J., PHILLIPS, M., GUSELLE, N. & MCALLISTER, T. A. 1999. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil, and cattle feces. *J Environ Qual*, 28, 1991-6.

OLSON, M. E., THORLAKSON, C. L., DESELLIERS, L., MORCK, D. W. & MCALLISTER, T. A. 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol*, 68, 375-81.

OLSSON, A., VANDERSTICHELE, H., ANDREASEN, N., DE MEYER, G., WALLIN, A., HOLMBERG, B., ROSENGREN, L., VANMECHELEN, E. & BLENNOW, K. 2005. Simultaneous measurement of beta-amyloid(1-42), total tau, and phosphorylated tau (Thr181) in cerebrospinal fluid by the xMAP technology. *Clin Chem*, 51, 336-45.

ORTEGA, Y. R., ROXAS, C. R., GILMAN, R. H., MILLER, N. J., CABRERA, L., TAQUIRI, C. & STERLING, C. R. 1997. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, 57, 683-6.

PANCIERA, R. J., THOMASSEN, R. W. & GARNER, F. M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol*, 8, 479-84.

PANDAK, N., ZELJKA, K. & CVITKOVIC, A. 2006. A family outbreak of cryptosporidiosis: Probable nosocomial infection and person-to-person transmission. *Wien Klin Wochenschr*, 118, 485-7.

PATEL, S., PEDRAZA-DIAZ, S., MCLAUCHLIN, J. & CASEMORE, D. P. 1998. Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. Outbreak Control Team South and West Devon 1995, Incident Management Team and Further Epidemiological and Microbiological Studies Subgroup North Thames 1997. *Commun Dis Public Health*, 1, 231-3.

PAVLASEK, I. 1999. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Klin Mikrobiol*, 3, 290-301.

PEDERSEN, C., DANNER, S., LAZZARIN, A., GLAUSER, M. P., WEBER, R., KATLAMA, C., BARTON, S. E. & LUNDGREN, J. D. 1996. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourin Med*, 72, 128-31.

PEETERS, J. E., VILLACORTA, I., VANOPDENBOSCH, E., VANDERGHEYNST, D., NACIRI, M., ARES-MAZAS, E. & YVORE, P. 1992. *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infect Immun*, 60, 2309-16.

PELLY, H., CORMICAN, M., O'DONOVAN, D., CHALMERS, R. M., HANAHOE, B., CLOUGHLEY, R., MCKEOWN, P. & CORBETT-FEENEY, G. 2007. A large outbreak of cryptosporidiosis in western Ireland linked to public water supply: a preliminary report. *Euro Surveill*, 12, E070503.3.

PENG, M. M., XIAO, L., FREEMAN, A. R., ARROWOOD, M. J., ESCALANTE, A. A., WELTMAN, A. C., ONG, C. S., MAC KENZIE, W. R., LAL, A. A. & BEARD, C. B. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis*, 3, 567-73.

PETRY, F. 2004. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microsc Microanal*, 10, 586-601.

PETRY, F. & HARRIS, J. R. 1999. Ultrastructure, fractionation and biochemical analysis of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Int J Parasitol*, 29, 1249-60.

PETRY, F., JAKOBI, V. & TESSEMA, T. S. 2010. Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp Parasitol*, 126, 304-9.

PICOT, J., GUERIN, C. L., LE VAN KIM, C. & BOULANGER, C. M. 2012. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64, 109-30.

PLUTZER, J. & KARANIS, P. 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet Parasitol*, 165, 187-99.

POKORNY, N. J., WEIR, S. C., CARRENO, R. A., TREVORS, J. T. & LEE, H. 2002. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. *J Parasitol*, 88, 641-3.

- POLLOCK, K. G., YOUNG, D., SMITH, H. V. & RAMSAY, C. N. 2008. Cryptosporidiosis and filtration of water from Loch Lomond, Scotland. *Emerg Infect Dis*, 14, 115-20.
- POLLOK, R. C., FARTHING, M. J., BAJAJ-ELLIOTT, M., SANDERSON, I. R. & MCDONALD, V. 2001. Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology*, 120, 99-107.
- PONNURAJ, E. M. & HAYWARD, A. R. 2001. Intact intestinal mRNAs and intestinal epithelial cell esterase, but not *Cryptosporidium parvum*, reach mesenteric lymph nodes of infected mice. *J Immunol*, 167, 5321-8.
- POSPISCHIL, A., STIGLMAIR-HERB, M. T., VON HEGEL, G. & WIESNER, H. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet Rec*, 121, 379-80.
- POWER, M. L., SHANKER, S. R., SANGSTER, N. C. & VEAL, D. A. 2003. Evaluation of a combined immunomagnetic separation/flow cytometry technique for epidemiological investigations of *Cryptosporidium* in domestic and Australian native animals. *Vet Parasitol*, 112, 21-31.
- POZIO, E., REZZA, G., BOSCHINI, A., PEZZOTTI, P., TAMBURRINI, A., ROSSI, P., DI FINE, M., SMACCHIA, C., SCHIESARI, A., GATTEI, E., ZUCCONI, R. & BALLARINI, P. 1997. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. *J Infect Dis*, 176, 969-75.
- PREIDIS, G. A., WANG, H. C., LEWIS, D. E., CASTELLANOS-GONZALEZ, A., ROGERS, K. A., GRAVISS, E. A., WARD, H. D. & WHITE, A. C., JR. 2007. Seropositive human subjects produce interferon gamma after stimulation with recombinant *Cryptosporidium hominis* gp15. *Am J Trop Med Hyg*, 77, 583-5.

PREISER, G., PREISER, L. & MADEO, L. 2003. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *J Am Coll Health*, 51, 213-5.

PRIEST, J. W., BERN, C., XIAO, L., ROBERTS, J. M., KWON, J. P., LESCANO, A. G., CHECKLEY, W., CABRERA, L., MOSS, D. M., ARROWOOD, M. J., STERLING, C. R., GILMAN, R. H. & LAMMIE, P. J. 2006. Longitudinal analysis of *Cryptosporidium* species-specific immunoglobulin G antibody responses in Peruvian children. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 123-31.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE STUDY GROUP. 1990. Cryptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features. Public Health Laboratory Service Study Group. *BMJ*, 300, 774-7.

QUIROZ, E. S., BERN, C., MACARTHUR, J. R., XIAO, L., FLETCHER, M., ARROWOOD, M. J., SHAY, D. K., LEVY, M. E., GLASS, R. I. & LAL, A. 2000. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *J Infect Dis*, 181, 695-700.

RAMIREZ, N. E., WARD, L. A. & SREEVATSAN, S. 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect*, 6, 773-85.

RIBEIRO, C. D. & PALMER, S. R. 1986. Family outbreak of cryptosporidiosis. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 292, 377.

RIGGS, M. W. 2002. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes Infect*, 4, 1067-80.

ROBERTSON, I. D., IRWIN, P. J., LYMBERY, A. J. & THOMPSON, R. C. 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol*, 30, 1369-77.

ROBERTSON, L. J. 2007. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. *Int J Food Microbiol*, 120, 201-16.

ROBERTSON, L. J., CAMPBELL, A. T. & SMITH, H. V. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol*, 58, 3494-500.

ROSALES, M. J., CORDÓN, G. P., MORENO, M. S., SÁNCHEZ, C. M. & MASCARÓ, C. 2005. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop*, 95, 74-8.

ROSE, J. B., HUFFMAN, D. E. & GENNACCARO, A. 2002. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol Rev*, 26, 113-23.

ROSSIGNOL, J. F. 2006. Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. *Aliment Pharmacol Ther*, 24, 887-94.

RYAN, U. M., MONIS, P., ENEMARK, H. L., SULAIMAN, I., SAMARASINGHE, B., READ, C., BUDDLE, R., ROBERTSON, I., ZHOU, L., THOMPSON, R. C. & XIAO, L. 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J Parasitol*, 90, 769-73.

SALLON, S., DECKELBAUM, R. J., SCHMID, II, HARLAP, S., BARAS, M. & SPIRA, D. T. 1988. *Cryptosporidium*, malnutrition, and chronic diarrhea in children. *Am J Dis Child*, 142, 312-5.

SANTIN, M., TROUT, J. M. & FAYER, R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol*, 155, 15-23.

SANTIN, M., TROUT, J. M., XIAO, L., ZHOU, L., GREINER, E. & FAYER, R. 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol*, 122, 103-17.

SCHMIDT, W., WAHNSCHAFTE, U., SCHAFER, M., ZIPPEL, T., ARVAND, M., MEYERHANS, A., RIECKEN, E. O. & ULLRICH, R. 2001. Rapid increase of mucosal CD4 T cells followed by clearance of intestinal cryptosporidiosis in an AIDS patient receiving highly active antiretroviral therapy. *Gastroenterology*, 120, 984-7.

SEYRAFIAN, S., PESTEHCHIAN, N., KERDEGARI, M., YOUSEFI, H. A. & BASTANI, B. 2006. Prevalence rate of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients in Iran. *Hemodial Int*, 10, 375-9.

SHAHIDUZZAMAN, M., DYACHENKO, V., KHALAFALLA, R. E., DESOUKY, A. Y. & DAUGSCHIES, A. 2009a. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitol Res*, 105, 1155-61.

SHAHIDUZZAMAN, M., DYACHENKO, V., OBWALLER, A., UNGLAUBE, S. & DAUGSCHIES, A. 2009b. Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol*, 162, 271-7.

SHIANN, K. V., RYTTER, R. & SPANIER, J. G. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA PCR analysis of bovine *Cryptosporidium parvum* strains isolated from the watershed of the Red River of the North. *Appl Environ Microbiol*, 64, 2262-5.

SKOGSTRAND, K., THORSEN, P., NORGAARD-PEDERSEN, B., SCHENDEL, D. E., SORENSEN, L. C. & HOUGAARD, D. M. 2005. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem*, 51, 1854-66.

- SLAVIN, D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol*, 65, 262-6.
- SLOPER, K. S., DOURMASHKIN, R. R., BIRD, R. B., SLAVIN, G. & WEBSTER, A. D. 1982. Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency. *Gut*, 23, 80-2.
- SMITH, H. 2008. Diagnostics. In: FAYER, R. & XIAO, L. (eds.) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2ed. FL: CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, pp.172-207.
- SMITH, H. V., NICHOLS, R. A. B. & GRIMASON, A. M. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol*, 21, 133-42.
- SMITH, H. V. & ROSE, J. B. 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol Today*, 14, 14-22.
- SMITH, K. E., STENZEL, S. A., BENDER, J. B., WAGSTROM, E., SODERLUND, D., LEANO, F. T., TAYLOR, C. M., BELLE-ISLE, P. A. & DANILA, R. 2004. Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at a farm day camp. *Pediatr Infect Dis J*, 23, 1098-104.
- SMITH, N. H., CRON, S., VALDEZ, L. M., CHAPPELL, C. L. & WHITE, A. C., JR. 1998. Combination drug therapy for cryptosporidiosis in AIDS. *J Infect Dis*, 178, 900-3.
- SORVILLO, F. J., LIEB, L. E., KERNDT, P. R. & ASH, L. R. 1994. Epidemiology of cryptosporidiosis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles County. *Am J Trop Med Hyg*, 51, 326-31.

SPANO, F. & CRISANTI, A. 2000. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Int J Parasitol*, 30, 553-65.

SPANO, F., PUTIGNANI, L., NAITZA, S., PURI, C., WRIGHT, S. & CRISANTI, A. 1998. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol Biochem Parasitol*, 92, 147-62.

SRETER, T., VARGA, I. & BEKESI, L. 1995. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens. *J Parasitol*, 81, 827-9.

STEINBERG, E. B., MENDOZA, C. E., GLASS, R., ARANA, B., LOPEZ, M. B., MEJIA, M., GOLD, B. D., PRIEST, J. W., BIBB, W., MONROE, S. S., BERN, C., BELL, B. P., HOEKSTRA, R. M., KLEIN, R., MINTZ, E. D. & LUBY, S. 2004. Prevalence of infection with waterborne pathogens: a seroepidemiologic study in children 6-36 months old in San Juan Sacatepequez, Guatemala. *Am J Trop Med Hyg*, 70, 83-8.

STURDEE, A. P., BODLEY-TICKELL, A. T., ARCHER, A. & CHALMERS, R. M. 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol*, 116, 97-113.

SUAREZ-LUENGAS, L., CLAVEL, A., QUILEZ, J., GONI-CEPERO, M. P., TORRES, E., SANCHEZ-ACEDO, C. & DEL CACHO, E. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet Parasitol*, 148, 231-5.

SULAIMAN, I. M., HIRA, P. R., ZHOU, L., AL-ALI, F. M., AL-SHELAHI, F. A., SHWEIKI, H. M., IQBAL, J., KHALID, N. & XIAO, L. 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol*, 43, 2805-9.

SULAIMAN, I. M., LAL, A. A. & XIAO, L. 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J Parasitol*, 88, 388-94.

SULAIMAN, I. M., MORGAN, U. M., THOMPSON, R. C., LAL, A. A. & XIAO, L. 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2385-91.

SULAIMAN, I. M., XIAO, L. & LAL, A. A. 1999. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4431-5.

SUNNOTEL, O., LOWERY, C. J., MOORE, J. E., DOOLEY, J. S., XIAO, L., MILLAR, B. C., ROONEY, P. J. & SNELLING, W. J. 2006. *Cryptosporidium*. *Lett Appl Microbiol*, 43, 7-16.

SURESH, P. & REHG, J. E. 1996. Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces. *J Clin Microbiol*, 34, 38-40.

TANGERMANN, R. H., GORDON, S., WIESNER, P. & KRECKMAN, L. 1991. An outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center in Georgia. *Am J Epidemiol*, 133, 471-6.

TANIUCHI, M., VERWEIJ, J. J., NOOR, Z., SOBUZ, S. U., LIESHOUT, L., PETRI, W. A., JR., HAQUE, R. & HOUP, E. R. 2011. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg*, 84, 332-7.

TANRIVERDI, S. & WIDMER, G. 2006. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infect Genet Evol*, 6, 113-22.

TANYUKSEL, M., GUN, H. & DOGANCI, L. 1995. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. *Scand J Infect Dis*, 27, 69-70.

TARVER, A. P., CLARK, D. P., DIAMOND, G., RUSSELL, J. P., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., COHEN, K. S., JONES, D. E., SWEENEY, R. W., WINES, M., HWANG, S. & BEVINS, C. L. 1998. Enteric beta-defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, 66, 1045-56.

TESSEMA, T. S., SCHWAMB, B., LOCHNER, M., FORSTER, I., JAKOBI, V. & PETRY, F. 2009. Dynamics of gut mucosal and systemic Th₁/Th₂ cytokine responses in interferon-gamma and interleukin-12p40 knock out mice during primary and challenge *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunobiology*, 214, 454-66.

THEODOS, C. M. 1998. Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol*, 40, 87-119.

THOMPSON, R. C. & SMITH, A. 2011. Zoonotic enteric protozoa. *Vet Parasitol*, 182, 70-8.

TORRES, J., GRACENEA, M., GOMEZ, M. S., ARRIZABALAGA, A. & GONZALEZ-MORENO, O. 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet Parasitol*, 92, 253-60.

TOZE, S. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Res*, 33, 3545-56.

TYZZER, E. E. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med*, 5, 12-13.

TYZZER, E. E. 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res*, 23, 487-510.

TYZZER, E. E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protist*, 26, 394-418.

TZIPORI, S. & WARD, H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*, 4, 1047-58.

UNGAR, B. L., MULLIGAN, M. & NUTMAN, T. B. 1989. Serologic evidence of *Cryptosporidium* infection in US volunteers before and during Peace Corps service in Africa. *Arch Intern Med*, 149, 894-7.

UNGAR, B. L., SOAVE, R., FAYER, R. & NASH, T. E. 1986. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J Infect Dis*, 153, 570-8.

URBAN, J. F., JR., FAYER, R., CHEN, S. J., GAUSE, W. C., GATELY, M. K. & FINKELMAN, F. D. 1996. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. *J Immunol*, 156, 263-8.

VAKIL, N. B., SCHWARTZ, S. M., BUGGY, B. P., BRUMMITT, C. F., KHERELLAH, M., LETZER, D. M., GILSON, I. H. & JONES, P. G. 1996. Biliary cryptosporidiosis in HIV-infected people after the waterborne outbreak of cryptosporidiosis in Milwaukee. *N Engl J Med*, 334, 19-23.

VALDEZ, L. M., DANG, H., OKHUYSEN, P. C. & CHAPPELL, C. L. 1997. Flow cytometric detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool samples. *J Clin Microbiol*, 35, 2013-7.

VESEY, G., DEERE, D., WEIR, C. J., ASHBOLT, N., WILLIAMS, K. L. & VEAL, D. A. 1997. A simple method for evaluating *Cryptosporidium*-specific

antibodies used in monitoring environmental water samples. *Lett Appl Microbiol*, 25, 316-20.

VESEY, G., SLADE, J. S. & FRICKER, C. R. 1991. Taking the eye strain out of environmental cryptosporidium analysis. *Lett Appl Microbiol*, 13, 62-5.

VETTERLING, J. M., JERVIS, H. R., MERRILL, T. G. & SPRINZ, H. 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J Protozool*, 18, 243-7.

VILLEGAS, E. N., WILLE, U., CRAIG, L., LINSLEY, P. S., RENNICK, D. M., PEACH, R. & HUNTER, C. A. 2000. Blockade of costimulation prevents infection-induced immunopathology in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 68, 2837-44.

WALDMAN, E., TZIPORI, S. & FORSYTH, J. R. 1986. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient. *J Clin Microbiol*, 23, 199-200.

WALDRON, L. S., FERRARI, B. C., CHEUNG-KWOK-SANG, C., BEGGS, P. J., STEPHENS, N. & POWER, M. L. 2011. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. *Appl Environ Microbiol*, 77, 7766-71.

WEBER, R., BRYAN, R. T. & JURANEK, D. D. 1992. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J Clin Microbiol*, 30, 2869-73.

WHITE, A. C., JR. 2003. Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy. *Am J Trop Med Hyg*, 68, 382-3.

WHITE, A. C., ROBINSON, P., OKHUYSEN, P. C., LEWIS, D. E., SHAHAB, I., LAHOTI, S., DUPONT, H. L. & CHAPPELL, C. L. 2000. Interferon-gamma

expression in jejunal biopsies in experimental human cryptosporidiosis correlates with prior sensitization and control of oocyst excretion. *J Infect Dis*, 181, 701-9.

WIDMER, G., TCHACK, L., CHAPPELL, C. L. & TZIPORI, S. 1998. Sequence polymorphism in the beta-tubulin gene reveals heterogeneous and variable population structures in *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol*, 64, 4477-81.

WOLSKA-KUSNIERZ, B., BAJER, A., CACCIO, S., HEROPOLITANSKA-PLISZKA, E., BERNATOWSKA, E., SOCHA, P., VAN DONGEN, J., BEDNARSKA, M., PAZIEWSKA, A. & SINSKI, E. 2007. *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiencies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45, 458-64.

WYNN, T. A. 2003. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*, 21, 425-56.

XIAO, L. 2009. Overview of *Cryptosporidium* presentations at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists. *Eukaryot Cell*, 8, 429-36.

XIAO, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*, 124, 80-9.

XIAO, L., BERN, C., LIMOR, J., SULAIMAN, I., ROBERTS, J., CHECKLEY, W., CABRERA, L., GILMAN, R. H. & LAL, A. A. 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis*, 183, 492-7.

XIAO, L., ESCALANTE, L., YANG, C., SULAIMAN, I., ESCALANTE, A. A., MONTALI, R. J., FAYER, R. & LAL, A. A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*, 65, 1578-83.

XIAO, L. & FAYER, R. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol*, 38, 1239-55.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U. & UPTON, S. J. 2004a. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*, 17, 72-97.

XIAO, L. & FENG, Y. 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52, 309-23.

XIAO, L., LAL, A. A. & JIANG, J. 2004b. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* oocysts in water by PCR-RFLP. *Methods Mol Biol*, 268, 163-76.

XIAO, L., MORGAN, U. M., FAYER, R., THOMPSON, R. C. & LAL, A. A. 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol Today*, 16, 287-92.

XIAO, L. & RYAN, U. M. 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis*, 17, 483-90.

XIAO, L., SULAIMAN, I. M., RYAN, U. M., ZHOU, L., ATWILL, E. R., TISCHLER, M. L., ZHANG, X., FAYER, R. & LAL, A. A. 2002. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol*, 32, 1773-85.

YODER, J. S. & BEACH, M. J. 2007. Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2003-2005. *MMWR Surveill Summ*, 56, 1-10.

YODER, J. S., WALLACE, R. M., COLLIER, S. A., BEACH, M. J. & HLAVSA, M. C. 2012. Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ*, 61, 1-12.

ZHU, G., KEITHLY, J. S. & PHILIPPE, H. 2000. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 1673-81.

ZU, S. X., LI, J. F., BARRETT, L. J., FAYER, R., SHU, S. Y., MCAULIFFE, J. F., ROCHE, J. K. & GUERRANT, R. L. 1994. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 51, 1-10.

Parte II

Infecção por *Cryptosporidium parvum*: resposta imunológica e tecnologia de anticorpos monoclonais para o diagnóstico

Capítulo 2

Objectivos

A criptosporidiose é uma importante patologia do ponto de vista da saúde humana e animal, e o seu agente etiológico, *Cryptosporidium*, tem-se afirmado ao longo dos anos como a principal causa mundial de enterite, autolimitada nos imunocompetentes mas que pode ser fatal em imunocomprometidos. Vários estudos salientam a importância das células Treg na regulação da resposta imunitária e inibição da imunopatologia desencadeada por este parasita. Outros estudos, demonstram que as células Th₁ e Th₂ também podem regular a resposta imune pela produção de imunoglobulinas e citocinas específicas. Contudo, a resposta imune a *C. parvum* ainda não está totalmente compreendida, pelo que se torna essencial a sua caracterização, a qual poderá contribuir para esclarecer a participação de cada tipo de célula na resposta imunológica e obter novos dados que permitam o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais. Adicionalmente, o elevado custo dos actuais métodos de diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium*, salientam a importância do desenvolvimento de novas abordagens.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objectivos gerais: caracterizar e compreender a resposta imunitária humoral e celular de longo-termo à infecção por *C. parvum*, no modelo animal imunocompetente, e em paralelo, aplicar a tecnologia de anticorpos monoclonais ao diagnóstico da infecção por *C. parvum*.

Foi dada particular atenção à caracterização das linhagens celulares envolvidas na dinâmica imunológica da criptosporidiose, através das seguintes abordagens específicas:

I) Caracterização das populações de células do sangue periférico e baço, e esclarecimento sobre a participação de cada tipo celular na resposta imunológica, por citometria de fluxo com painel específico de anticorpos monoclonais;

II) Estudo imunológico dos perfis de mediadores imunes, citocinas e imunoglobulinas, por tecnologia xMAP[®] Luminex, a partir do soro de murganhos infectados;

III) Selecção de hibridomas em culturas celulares, por fusão de células de mieloma com esplenócitos obtidos de murganhos previamente imunizados com *C. parvum*, para produção de anticorpos com especificidade para antígenos de oocistos do parasita;

IV) Aplicação dos anticorpos obtidos ao diagnóstico em amostras de doentes infectados por *C. parvum*.

Capítulo 3

Cell phenotypic change due to *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent mice

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

CODICES, V., MARTINS, C., NOVO, C., PINHO, M., DE SOUSA, B., LOPES, A., BORREGO, M. & MATOS, O. 2013. Cell phenotypic change due to *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent mice. *Acta Parasitol*, 58, 70-9.

Anexos 1 e 2- Imagens fornecidas aos revisores deste artigo para justificar a metodologia utilizada e os resultados obtidos.

DOI: 10.2478/s11686-013-0113-2

© W. Stefański Institute of Parasitology, PAS

Acta Parasitologica, 2013, 58(1), 70–79; ISSN 1230-2821



Cell phenotypic change due to *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent mice

Vera Codices¹, Catarina Martins², Carlos Novo^{2,3}, Mário Pinho⁴, Bruno de Sousa⁵, Ângela Lopes⁶, Miguel Borrego² and Olga Matos^{1*}

¹Unidade de Parasitologia Médica, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, CMDT, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal; ²Centro de Estudos de Doenças Crônicas, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; ³Unidade de Parasitologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; ⁴Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal;

⁵Unidade de Saúde Internacional e Bioestatística, CMDT, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; ⁶Unidade de Tecnologias de Proteínas e Anticorpos Monoclonais, presently Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Abstract

Cryptosporidium parvum is an intracellular parasite causing enteritis which can become life-threatening in immunocompromised host. Immunoregulatory T cells play a central role in the regulatory network of the host. Here, we proposed to characterize the populations of immune cells during infection and reinfection with *C. parvum*. Four-week-old BALB/C mice were inoculated with oocysts of *C. parvum* at days 0 and 22. Fecal and blood samples, spleens, and small intestines were collected for analysis. Peripheral blood and spleen cell populations were characterized by flow cytometry. After infection (days 0 to 21), mice presented higher values of neutrophils, eosinophils, NK cells and CD4⁺CD25^{high} T cells in peripheral blood. After reinfection, this upward trend continued in the following days for all four populations in infected mice. At day 35, infected mice presented similar values to the control group, except for CD4⁺CD25^{high} T cells, which remained higher in infected mice. A possible correlation between alterations in blood and spleen cell populations was also studied, but no consistent association could be established. Small intestine sections were screened for intracellular stages of the parasite but no evidence of pathology was observed. Here, we report information which may be important for the understanding of the specific cell-mediated response in immunocompetent mice to *C. parvum* infection. Although some questions remain unanswered and complementary studies are needed, our results are expected to contribute to a better understanding of innate and Treg cells role in the clearance process of this parasite.

Keywords

Cryptosporidium, immunophenotype, flow cytometry, B-lymphocytes, T-lymphocytes

Introduction

Cryptosporidium spp. are apicomplexan protozoan parasites with a worldwide distribution, causing gastrointestinal disease in humans and animals. *Cryptosporidium parvum* is the most prevalent species and causes short-term self-limiting diarrheal illness in immunocompetent hosts. Recovery is complete, and the vast majority of recovered individuals are resistant to reinfection. Immunocompromised individuals such as AIDS patients experience prolonged diarrhea associated with persistent infection of intestinal epithelial cells, which can be life-threatening (Fayer and Ungar 1986, Blanshard *et al.* 1992, Fayer *et al.* 2000, Matos *et al.* 2004, Xiao and Fayer 2008). Humans

can acquire *Cryptosporidium* infections through several routes, such as anthroponotic, zoonotic, food and waterborne transmission. Oocysts are immediately infectious when excreted in feces and highly resistant to environmental stress, disinfectants, and some treatment technologies. These characteristics facilitate their dissemination in water, and have given rise to several waterborne outbreaks (Mac Kenzie *et al.* 1994, Fayer *et al.* 2000, Xiao *et al.* 2006, Xiao and Feng 2008, Xiao and Ryan 2008).

Furthermore, *C. parvum* has a considerable economic importance in veterinary medicine, particularly in newborn ruminants where it causes weight loss, dehydration and death (Fayer and Ungar 1986).

*Corresponding author: omatos@ihmt.unl.pt

A complex sequence of events involving various components of the host response has shown to be important in the control of *C. parvum* infection and critically dependent on the immune status of the host. It means that the study of the immune response to the parasite would improve the knowledge of the host defense mechanisms and the choice of better targets for therapy. To date, specific therapeutic or preventive interventions are not yet available. Few studies on the immune response in humans have been done, some of which mainly dealing with systemic antibody responses and others addressing their attention on the humoral and cell-mediated immune response. Generally, these studies conclude that despite the many advances made in understanding immune responses to *C. parvum*, some infection mechanisms not clear and a lot remains unknown (Theodos 1998, Riggs 2002, Gomez Morales *et al.* 2004, Borad and Ward 2010, Petry *et al.* 2010). Improvements in this area have been hampered by the lack of studies in immunocompetent animal models. Most experiments have been performed in neonatal or immunocompromised mice, with lacking functional T and/or B cells, and targeted mutations on major histocompatibility complex (MHC) class-II, alpha-beta-T-cell receptor ($\alpha\beta$ -TCR) and interferon-gamma (INF- γ) (McDonald *et al.* 1992, Aguirre *et al.* 1994, McDonald and Bancroft 1994, Perryman *et al.* 1994, McDonald 2000).

Several studies suggest that innate immune response initially limits the parasite number but the clearance of the infection ultimately requires a T-cell-mediated response, emphasizing the importance of CD4⁺ cells in the protective immunity towards *C. parvum*.

Nevertheless, limited information is available on the specific subset and function of these cells (Aguirre *et al.* 1994, Waters and Harp 1996). More recently, it has become clear that avoidance of damage to the host by foreign microorganisms is also possible to achieve by active suppression mediated by regulatory T cells (Treg) populations (Maloy and Powrie 2001, Belkaid and Tarbell 2009). However, we should keep in mind that, although Treg cells have an important role in the regulation of immune responses, T-helper type 1 (Th₁) and type 2 (Th₂) cells can also regulate immune responses in this context through the production of specific cytokines (Lean *et al.* 2002). CD4⁺CD25⁺ Treg cells are "naturally occurring" subpopulation of Treg and their role in the initiation and development of immune response has been widely studied (O'Garra and Vieira 2004, Belkaid and Tarbell 2009, Borrego *et al.* 2009). Some authors showed, in mice, that these cells are the hematopoietic components that reverse, or at least, prevent the disease (Fontenot *et al.* 2003). Due to the inherent difficulties in using CD25 as a marker for the purification of Treg cells, the finding that selection of the CD25^{high} subset of CD4⁺CD25⁺ T cells minimizes the co-isolation of contaminating activated CD4 T cells is important for future studies on the role of these cells in human disease (Baecher-Allan *et al.* 2005). Although not tested in this study, there are other molecules that can also be used for the identification and isolation

of Treg cells (transcription factor Foxp3 and IL7R - CD127) (Fontenot *et al.* 2003, Baecher-Allan *et al.* 2005, Banham 2006, Liu *et al.* 2006).

In this study, four-week-old BALB/C ByJ strain mice under specific-pathogen-free (SPF) conditions were used as animal model. *Cryptosporidium* infection was performed with purified oocysts. Evaluation of *C. parvum* cell-mediated response was done by flow cytometry (FC) through the peripheral blood and spleen cell population analysis. Histological analysis of small intestine and spleen has also been done. It is expected to analyze and characterize (immunophenotyping) changes in peripheral blood and spleen cell populations due to *C. parvum* infection, which could help clarify some aspects of the immune response to this infection.

Materials and Methods

Mice: Four-week-old female BALB/C ByJ mice were obtained from Charles River Laboratories (France). Mice were acclimated and housed in separate sterilized plastic cages with filter top, and fed with sterilized food and water (pH 3.5) *ad libitum* under SPF conditions.

Parasites and infection studies: Purified oocysts of *C. parvum* (Moredun strain) from cervine origin were purchased at Creative Science Company/Moredun Institute (Edinburgh, Scotland). According to the supplier, oocysts were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and stored at 4°C in the presence of antibiotics (penicillin and streptomycin). The viability of the oocysts preparation, checked by *in vitro* excystation, was 94.7%.

Seven groups of three animals each were inoculated with 1×10^6 *C. parvum* oocysts in 80 μ l of PBS per mouse by oral gavage. Four groups of three mice each were gavaged with PBS and used as control. One group of infected mice was euthanized on each of days 3, 7, 14 and 21 post-infection (PI) and one group of control mice was euthanized on each of days 3 and 14. In order to analyze the mechanisms conferring resistance towards infection with *C. parvum*, the remaining groups of infected mice were rechallenged with 1×10^6 oocysts in 80 μ l of PBS per mouse on day 22 PI. On each of days 25, 28 and 35 PI (days 3, 6 and 13 post-reinfection [PRI], respectively) a group of infected mice was also euthanized and on days 28 and 35 a group of control mice was also euthanized.

At each time point the feces, blood, spleens and small intestines were collected for analysis. Care was taken to keep the same level of animal handling for all groups.

The presence of *C. parvum* DNA in feces was confirmed by a nested-PCR of the 60-kDa glycoprotein (GP60) gene (Glaberman *et al.* 2002, Alves *et al.* 2003) after extraction of DNA by a Mini-BeadBeater/silica method (Alves *et al.* 2001). The presence of oocysts in feces was determined in fecal smears stained by a modified Ziehl-Neelsen method (Casemore *et al.* 1985) after oocyst concentration using a modified water-

ether sedimentation method (Alves *et al.* 2000) and then observed under an optical microscope with 400x magnification.

Simultaneously, the active infection in small intestines of mice was confirmed by histological methods. Morphological changes in the spleen were also evaluated. For this purpose, tissues samples were removed from euthanized mice and fixed in 10% buffered formalin solution, processed for paraffin embedding and sectioned. Small intestine sections were stained with hematoxylin-eosin and with FITC-labeled monoclonal antibody reagent for direct immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts (Crypt-a-Glo™, A400FLR-1X, Waterborne, Inc, New Orleans, Los Angeles) in accordance with the laboratory procedures and examined at a magnification of x400. Spleen sections were stained only with hematoxylin-eosin and examined at a magnification of x200.

All protocols and experiments involving animals were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines with specific approval by the animal care committee.

Flow cytometric analysis of spleen and peripheral blood cell populations: Peripheral blood and spleen were aseptically collected from euthanized mice. Peripheral blood was collected from the vena cava. Splenocytes were obtained by gentle removal of spleen's contents, followed by a mechanical disassociation protocol, using BD Medimachine system/BD Medicon and BD Filcon Filters (BD Biosciences, San Jose, California). The protocol was adjusted according to the cytometer manufacturer's instructions. Red blood cells from mouse peripheral blood and spleen cell suspension were lysed using BD Biosciences Pharmingen's PharM Lyse™ solution. Five milliliters of 1X Lysing Solution per spleen cell suspension or per 250 µl of mouse peripheral blood were added. Samples were gently vortexed and incubated at room temperature, in the dark, for 5 min. After centrifugation at 200 x g for 5 min, supernatants were carefully aspirated and discarded. Each pellet was resuspended in 500 µl of cold wash buffer (Facs Flow BD Biosciences). After centrifugation at 350 x g for 5 min, the supernatants were discarded and the pellet resuspended to a concentration of 2×10^7 cells/ml (i.e., 10^6 cells per 50 µl). The used mAbs (obtained from BioLegend, San Diego, California) were: anti-mouse CD4 APC (clone GK1.5), anti-mouse CD8a PE (clone 53-6.7), anti-mouse CD19 APC (clone 6D5), anti-mouse CD3ε PerCP (clone 145-2C11), anti-mouse CD45 FITC (clone 30-F11), anti-mouse CD49b PE (clone DX5), anti-mouse CD25 PE (clone PC61), anti-mouse TCRγδ FITC (clone GL3) and anti-mouse TCRβ FITC (clone H57-597). Each mAb was diluted to predetermined optimal concentration in wash buffer and placed in several tubes in a volume of 50 µl. About 100 µl of resuspended pellet (10^6 cells) were added to each tube already containing 50 µl of mAb (or 50 µl wash buffer for negative controls). After mixing by gently vortexing, all tubes were incubated at 4°C for 30 min in the dark. Two washes were made with 200 µl of wash buffer followed by centrifugation at 350 x g for 5 min and supernatant removed by aspiration. Labeled cell pellets were re-

suspended in 200 µl of wash buffer and analyzed on a BD FACS Calibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, California) equipped with an air-cooled argon laser, with an excitation wavelength of 488 nm, and a red diode laser, with an excitation wavelength of 685 nm. Instrument settings were previously adjusted and controlled following the standard procedures.

Cell Quest 3.3™ (BD Biosciences) software was used for both acquisition and analysis. In each tube, 40,000 leukocyte events (CD45⁺) were acquired. Results were presented as a percentage of total leukocytes for major populations, identified according to their forward angle light scatter (FSC) and side angle light scatter (SSC), and also the expression of CD45 (neutrophils, monocytes, lymphocytes and eosinophils). Within the lymphocytes, T, B and natural killer (NK) populations were identified according to the expression of CD3, CD4, CD8, CD19 and CD49b, and presented as a percentage of total lymphocytes. TCRαβ⁺ T cells (assessed as the population of cells expressing the TCRβ chain) were also evaluated according to their expression of CD4 and CD8, and classified in CD4⁺, CD8⁺, double negative (DN) and double positive (DP) cells. Finally, a combined Boolean Gating Strategy was used for the evaluation of CD25 expression within CD3⁺CD4⁺ T cells. For this purpose, 10,000 to 15,000 CD3⁺CD4⁺ T cells were acquired in each tube, and a fluorescence minus one (FMO) control tube was also used. CD3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells were identified as the cells with higher fluorescence intensity than the FMO tube. Within this population, CD3⁺CD4⁺CD25^{high} T cells were identified as the small cluster presenting higher CD25 expression (above the second decade in the fluorescence logarithmic scale).

Statistical analysis: Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test, since the data did not meet the criteria of normality and homogeneity of variance necessary to apply the t-test. Statistical significance was defined by a *p*-value of less than 0.05. With this test the authors analyzed if there were statistical significant differences among the values of the populations in the spleen and peripheral blood, determined by FC for each mouse, after infection and reinfection. Tests were performed using IBM SPSS Statistics version 19 software (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.).

Results

Infectivity assay: Fecal samples were collected from each group of mice on days 3, 7, 14, 21, 25, 28 and 35 PI. The occurrence of oocysts in feces was determined in fecal smears of concentrated oocysts stained by a modified Ziehl-Neelsen method, followed by observation under an optical microscope with 400x magnification.

Although the load of oocysts was low (8–12 oocysts), they could be observed on days 3 and 7 PI. The presence of gDNA of *C. parvum* in feces was determined by a nested-PCR of 60-kDa glycoprotein gene and a band of DNA (400 bp) was ob-



Fig. 1. Histological examination of small intestine. Light photomicrograph of small intestine from a *C. parvum* infected mouse, at day 25 PI (day 3 PRI). Arrows indicate intracellular stages of the parasite lining the luminal surface of enterocytes (hematoxylin-eosin stain, x400)

served only on days 3, 7 and 14 PI. Feces from control mice were also analyzed in all time points, by microscopy and nested-PCR, in duplicate, and were all negative. The active infection in small intestines of mice was confirmed by histological examination. Small intestine sections from euthanized mice in all time points only showed a low number of intracellular parasite stages (5–10 parasites) in the superficial border of the villi (Fig. 1) on days 21, 25 and 35 PI. In sections ana-

lyzed by immunofluorescence in all time points, a low number of oocysts (5–10 oocysts) were also observed. Particular attention was also given to the possibility of an influx of eosinophils to the site of infection that could be correlated with the increased number of systemic eosinophils. No noticeable changes consistent with infection were observed in any of those days. In order to check any possible correlation between alterations in blood and spleen cell populations, histological changes in sections of spleen of infected mice were also evaluated by light microscopy. On days 25 and 28 PI (3 and 6 days PRI, respectively), all spleens of infected mice have shown signs of splenomegaly. Microscopically, the major feature of these spleens was a mild congestion of the red pulp, with no noticeable changes in the appearance of the white pulp.

Flow cytometry analysis: Analysis of peripheral blood – leukocyte subpopulations: Considering the major leukocyte subpopulations, neutrophils mean percentages varied between 31.42%–52.49% in infected mice, and 29.04%–45.33% in the control group (as shown in Table I). Analyzing the evolution of this population after infection and reinfection (days 0 and 22), neutrophil percentages appeared to rapidly increase (days 3 and 25), and then start to recover, approaching the values observed in the control group.

For eosinophils, mean percentage values of this population were higher in infected mice, varying between 3.29%–5.61%, compared to 1.00%–4.78% for the control group. Although eosinophil values in infected mice were significantly higher than those in control mice until day 28, this difference decreased and reached similar values at day 35.

The lymphocyte population presented values between 36.36%–57.01% in infected mice and values between 39.86%–56.25% in control mice. Lymphocytes and neutrophils are normally the two major leukocyte populations in mice peripheral blood, although they present inverted tendencies. Lymphocytes percentage increased after infection, until day 21, and then rose again after reinfection. Nevertheless, after both exposure periods, the lymphocyte population seemed to recover, presenting values closer to those observed in the control group.

Table I. Flow cytometry analysis for leukocyte subpopulations. Mean percentage values for leukocyte populations (neutrophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes) in peripheral blood, along the infection and reinfection processes (35 days), in both infected and non-infected control mice

Day	Neutrophils (%)		Eosinophils (%)		Lymphocytes (%)		Monocytes (%)	
	IM	CM	IM	CM	IM	CM	IM	CM
3	49.44	45.33	4.25	1.99	40.23	39.86	5.20	10.05
7	43.12	–	3.29	–	45.95	–	7.36	–
14	37.72	34.80	3.69	1.30	50.39	52.03	8.19	6.36
21	35.76	–	5.61	–	51.46	–	6.60	–
22	Reinfection							
25	52.49	–	4.93	–	36.36	–	6.22	–
28	31.42	29.04	3.75	1.00	57.01	56.25	7.38	10.00
35	31.96	40.60	4.81	4.78	55.01	46.53	8.22	7.95

IM - infected mice; CM - control mice.

Table II. Flow cytometry analysis for lymphocyte subpopulations. Mean percentage values for lymphocyte subpopulations in peripheral blood, along the infection and reinfection processes (35 days), in both infected and non-infected control mice. The discrepancy observed between the summary of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the total T cells matches to the DP and DN cells (data not shown)

Day	B (%)		NK (%)		T (%)		CD4 ⁺ T (%)		CD8 ⁺ T (%)	
	IM	CM	IM	CM	IM	CM	IM	CM	IM	CM
3	33.27	26.16	10.15	6.87	53.72	64.47	42.20	44.81	7.78	7.57
7	23.79	–	6.84	–	65.72	–	48.65	–	8.92	–
14	31.69	36.18	12.01	6.34	52.89	55.07	42.59	41.02	7.58	7.10
21	40.29	–	11.39	–	44.30	–	28.92	–	8.56	–
22	Reinfection									
25	42.64	–	11.72	–	43.35	–	26.74	–	4.99	–
28	38.65	35.74	11.67	8.22	48.41	54.01	33.15	38.59	8.97	8.94
35	32.73	44.55	14.91	20.14	51.60	30.94	37.80	11.07	6.36	5.51

B – B cells (CD19+ lymphocytes); NK – Natural Killer cells (CD49b+ lymphocytes); T – T cells (CD3+ lymphocytes); DP – Double positive cells; DN – Double negative cells; IM – infected mice; CM – control mice.

Table III. Flow cytometry analysis of lymphocytes in spleen cells. Mean percentage values for lymphocytes and lymphocyte subpopulations in spleen samples, along the infection and reinfection processes (35 days), in both infected and non-infected control mice

Day	L (%)		B (%)		NK (%)		T (%)		CD4 ⁺ T (%)		CD8 ⁺ T (%)	
	IM	CM	IM	CM	IM	CM	IM	CM	IM	CM	IM	CM
3	84.36	80.12	57.84	50.70	2.55	2.26	36.65	44.92	20.30	16.71	7.48	7.76
7	83.53	–	47.41	–	3.67	–	47.75	–	25.51	–	9.82	–
14	89.05	–	44.07	–	3.97	–	50.73	–	21.22	–	9.04	–
21	82.21	–	53.07	–	4.46	–	41.29	–	18.87	–	7.47	–
22	Reinfection											
25	78.21	–	51.50	–	5.31	–	42.85	–	19.34	–	7.45	–
28	85.02	–	50.99	–	6	–	42.07	–	25.97	–	8.16	–
35	87.22	–	53.16	–	4.12	–	41.81	–	23.53	–	8.68	–

L – Lymphocytes (evaluated within total leukocyte events); B – B cells (CD19+ lymphocytes); NK – Natural Killer cells (CD49b+ lymphocytes); T – T cells (CD3+ lymphocytes); IM – infected mice; CM – control mice.

Monocytes showed mean percentage values between 5.2%–8.22% in infected mice, and between 6.36%–10.05% in control mice, which are not significantly different. Considering the values obtained in both groups, we can only point out minor decreases in percentage populations values in infected mice after infection and reinfection (days 3 and 25).

The significance of the results was limited due to the small number of mice. In most leukocyte populations (neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes) no statistically significant differences were observed among the mean values of infected and reinfected mice.

Analysis of peripheral blood – lymphocyte subpopulations: Lymphocytes, as previously mentioned, showed a tendency to decrease on days 3 and 25, after both infection and reinfection (days 0 and 22). In the control groups (Table II), within the lymphocyte subpopulations, B cells (CD19⁺) and NK cells (CD49b⁺) seemed to gain relevance through time. B cells and NK cells percentage ranged between 26.16%–44.55% and 6.34%–20.14%, respectively, while T cells

(CD3⁺) showed a decreasing tendency from 64.47% to 30.94%, as well as the CD4/CD8 ratio (data not shown).

In infected mice, mean values of B cells oscillated between 23.79% and 42.64%, but with the initial percentage of cells (33.27%) similar to the final one (32.73%). From day 25 to day 35, however, data show that B cells in infected animals did not follow the increasing tendency observed in the control group.

In infected animals, NK cells presented generally higher values than those observed in the control group. The only exception was day 35, with infected animals presenting a decrease in percentage values when compared to the control group (infected mice: 14.91%; control mice: 20.14%).

The data also showed that the percentage of T cells in infected mice, at days 3 and 25 diminished when compared with the control group, and then started to recover in value, achieving normal levels one week after the infection challenge. At day 35, however, both T cells and CD4⁺ T cells appeared to maintain higher values in infected animals.

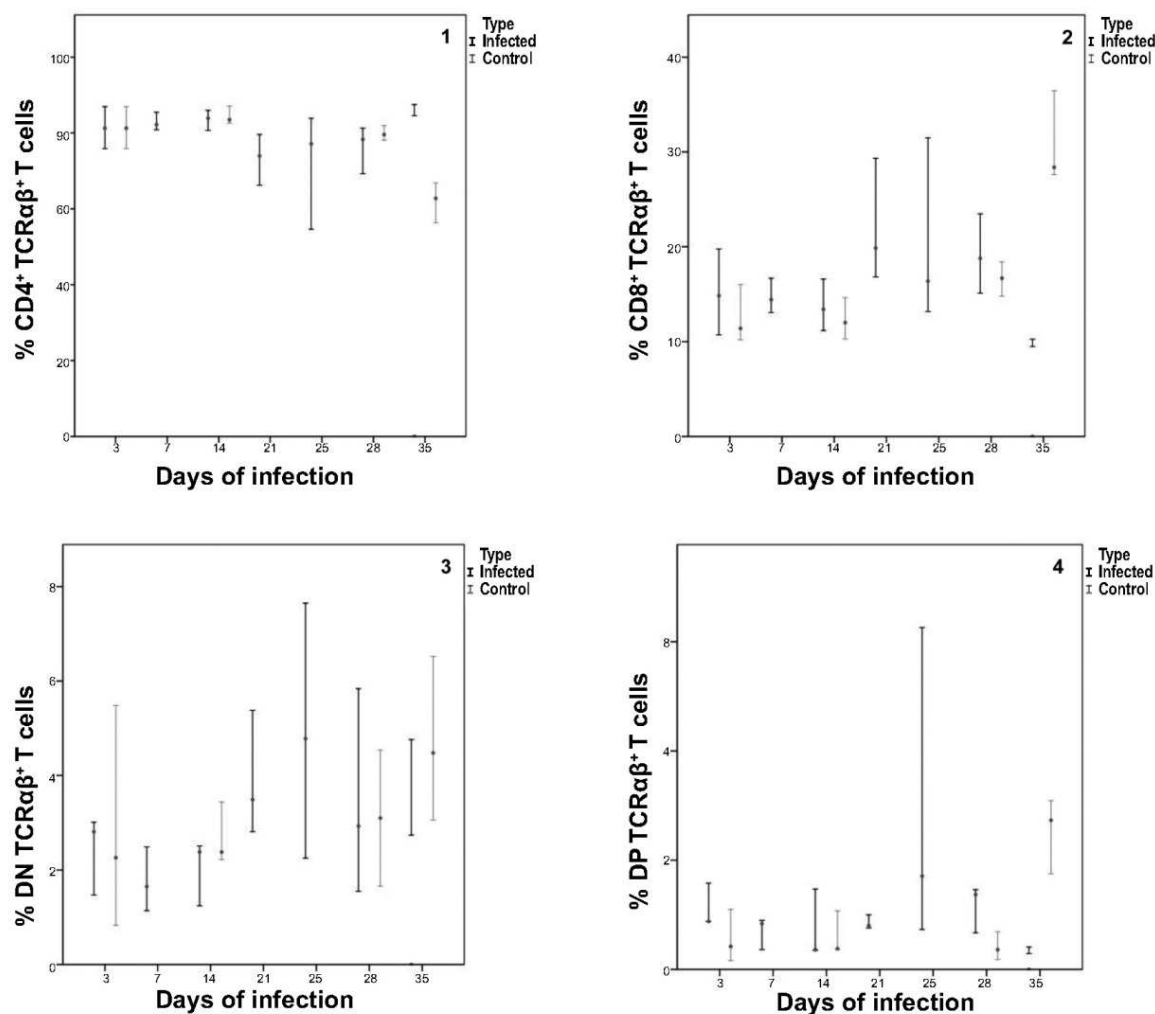


Fig. 2. Variability of TCRαβ⁺ T cell subpopulations. Graphics showing the variability in the data obtained from the analysis of peripheral blood, along the infection period (35 days), of TCRαβ⁺ T cells subpopulations divided according to their expression of CD4 and CD8: CD4⁺ TCRαβ⁺ T cells (graphic 1), CD8⁺ TCRαβ⁺ T cells (graphic 2), DN TCRαβ⁺ T cells (graphic 3) and DP TCRαβ⁺ T cells (graphic 4). Each graphic represents the results obtained for a group of three mice [first (-), second (dot), and third (-) values], infected and control, except for day 35, in which a mouse died in the infected group

To evaluate whether there were differences in the TCRαβ and TCRγδ T cell populations or not, CD4 and CD8 expression was assessed in TCRαβ⁺ T cells (identified by the expression of the TCRβ chain). Figure 2 represents the three values obtained for each group, except for day 35, which had only two mice because one mouse died. No significant differences were observed between infected and non-infected mice. Due to the small sample size, no statistical tests could be applied. At day 35, only DN TCRαβ⁺ T cells (3) followed the control tendencies. Compared to control values, CD4⁺ TCRαβ⁺ T cells (1) percentage values showed consistently higher values in infected mice, and DP (4) and CD8⁺ TCRαβ⁺ T cells (2) showed consistently lower values in infected mice. Generally, variability appeared to be larger for the infected group.

The significance of the results was limited due to the small number of mice. In lymphocyte subpopulations (B cells, NK cells, T cells, and within T cells, CD4⁺ and CD8⁺ cells) no statistically significant differences were observed among the mean values of both infected and reinfected mice. Among all populations in this study, CD8⁺ and DN cells presented lower *p*-values than all the other cells (CD8⁺, *p* = 0.054 and DN, *p* = 0.105), which, although not statistically significant, is an interesting result that deserves attention in future research studies.

Finally, CD25 expression was also evaluated in the CD3⁺CD4⁺ T cell population. CD25 is an activation marker in T cells, and within a special population of T cells with regulatory properties (Treg), that express high levels of this mole-

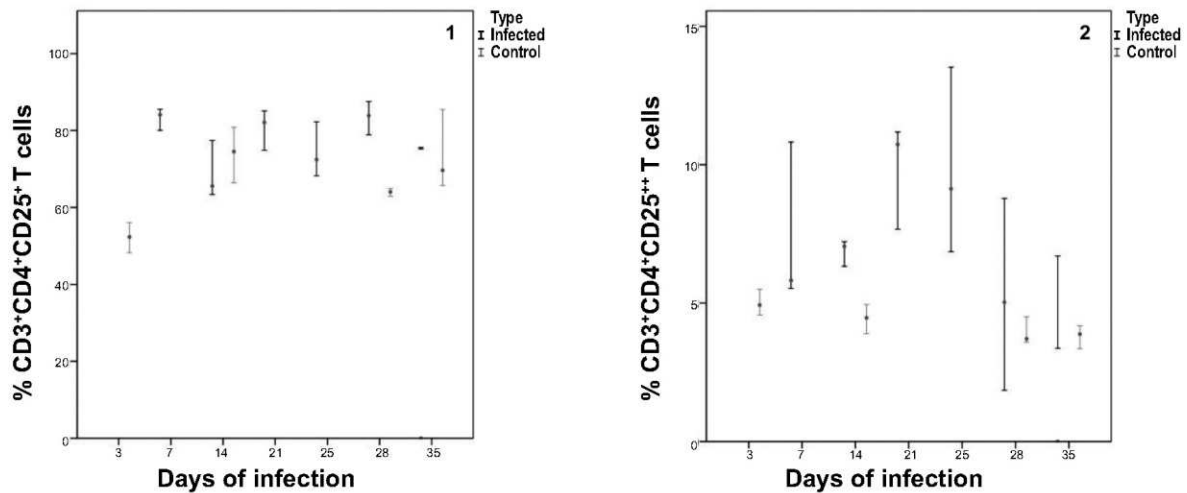


Fig. 3. Variability of CD25 expression in CD3⁺CD4⁺ T cells. Graphics showing the variability in the data obtained from the analysis of peripheral blood, along the infection period (35 days), of CD25 expression in CD3⁺CD4⁺ T cells: CD3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells (graphic 1) and CD3⁺CD4⁺CD25⁺⁺ T cells (graphic 2). Each illustration represents the results obtained for a group of three mice [first (-), second (dot), and third (+) values], infected and control, except for day 35, in which a mouse from infected group died

cule. Thus, the expression of CD25 was assessed assuming two populations: CD3⁺CD4⁺CD25⁺ and CD3⁺CD4⁺CD25^{high} T cells. The analysis of the graphic 1 in Fig. 3 suggests that CD3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells were generally present in higher values in infected animals, 68.80%–83.42%, versus 52.21%–73.94% in control mice. No significant differences between both groups of mice were observed in each set point and, at day 35, both groups presented similar values. Furthermore, the population of CD4⁺ T cells showing higher CD25 expression (CD3⁺CD4⁺CD25^{high} T cells), presented significantly higher percentage values in infected mice throughout the study (Fig. 3, graphic 2). These cells, a small percentage within CD3⁺CD4⁺ T cells (5.04%–9.86% in infected mice versus 3.8%–5.0% in control mice), presented even higher values in the infected group at days 21 and 25, a period of time during which the reinfection process occurred (day 22).

Analysis of spleen cell populations: Spleen samples were collected at each time point in infected mice, while in control mice, spleen samples were analyzed only for the first time point (day 3). Since lymphocytes are the major population in the spleen, only they were evaluated (Table III). For all types of lymphocytes, a pattern can be observed across the two infection challenges, where after the first week the lymphocyte percentages tended to increase (days 14, 28 and 35), while B cells showed an increase immediately after infection, and then they oscillated, near the mean value found in the spleen of the control group (50.7%). NK cells started with a 2.55% mean value then increased constantly to 6% until day 35, in which they started to decrease to 4.12%.

CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were also analyzed. In CD3⁺ T cells, a peak was observed at days 7 (47.75%) and 14 (50.73%) PI, reaching higher values than those observed in the spleen of the control group (44.92%). However, after this

period, the percentage values within this population plateaued at a slightly lower level than the peak value. As for CD4⁺ and CD8⁺ T cells, both populations increased one week after the infection challenge (day 7). Nevertheless, after this period, both populations percentages started to decrease (days 21 and 25), closer to those observed in control mice. The reinfection episode, in day 22, somewhat mimics what was observed after the first infection point, as both populations achieved higher values a week after (day 28).

Discussion

The more we know about immune effector mechanisms that protect vertebrate hosts against opportunistic pathogens, the better the chances are to develop immunotherapeutic strategies for controlling diseases such as cryptosporidiosis. *C. parvum* is predominantly an intestinal pathogen. However, we decided to analyze immunophenotypic changes and potential differences in cell population from peripheral blood and spleen in orally infected mice because modifications induced in the immune system to overcome the infection, may be reflected as changes in peripheral blood and spleen cell populations.

Although the majority of the studies have been done on neonatal and immunosuppressed mice (Certad *et al.* 2007), we consider it important to study what occurs in the immunocompetent animal because this type of infection also takes place in immunocompetent persons.

In previous studies using the same animal model (Kapel *et al.* 1996, Marriotte *et al.* 2004), infective doses ranged from 10⁴ to 10⁶ oocysts and infection was not monitored beyond 27 days PI. So, in this work, we decided to monitor the infection for a longer period of time (35 days), with seven time points

and a higher inoculum of oocysts (1×10^6), instead of increasing the number of mice. With this first approach, we attempted to understand the tendencies of the cell population's evolution.

Due to the high amount of administered inoculum by oral gavage to mice, it would be expected to find a large amount of oocysts in feces, which did not occur. Our data showed that the onset of parasite shedding was low and only detectable by microscopy on days 3 and 7 PI. The presence of DNA of *C. parvum* in feces was detected on days 3, 7 and 14 PI. Those events might be due to the fact that oocysts have undergone excystation or have been destroyed during the normal gut transit. Furthermore, mice did not show any signs of disease such as weight loss, diarrhea or inactivity. In contrast to humans, who are susceptible to infection throughout life, animals including mice develop resistance to infection after the neonatal period.

Small intestinal sections from infected mice euthanized on days 3, 7, 14, 21, 25, 28 and 35 PI were screened for intracellular stages of the parasites. Histological examination with hematoxylin-eosin stain showed 5–10 intracellular parasite stages in the superficial border of villi of intestine. However, there was no evidence of histopathological changes due to the infection when compared with the intestinal sections of the uninfected mice, in agreement with previous studies (Current and Garcia 1991; Wyatt *et al.* 1997; Del Coco *et al.* 2012). Particular attention was given to the possibility of an influx of eosinophils to the site of infection that could be correlated with the increased number of systemic eosinophils, but we did not observe any changes consistent with infection.

Spleen sections were observed with hematoxylin-eosin for the same time points and the possible correlation between alterations in the blood and spleen cell populations was also studied. On days 25 and 28 PI (days 3 and 6 PRI, respectively), all of the euthanized mice presented with enlarged spleens (splenomegaly) with a size three times higher than the control mice. In the enlarged spleens we could observe that the proportion of both red and white pulps were similar. A mild congestion was observed in the red pulp of the enlarged spleens due to the increase in the cellular density; while the cellular density of the white pulp was similar in the spleens of both infected and control mice. Enlarged spleens may be attributable, in part, to the observed red pulp congestion. Thus, splenomegaly may be consistent with reinfection and related to the reinoculation event, may be due to stimulation of the immune response in the spleen, in agreement with what was reported by other authors (Miller and Schaefer 2007).

In this work, we expected to see an inflammatory response initiated by *C. parvum* attachment and development in the small intestine, characterized by an increase of circulating neutrophils followed by a gradual increase in circulating lymphocytes immediately after infection. Effectively, we observed an increase of neutrophils at day 3 PI, followed by decrease of their percentage until day 21 PI, and a new increase on day 25 PI (3 days PRI) followed by decrease until day 35 PI reaching

similar values to the control group. These data suggest an initial inflammatory response to inoculation events (primary and secondary infection), with an increase of circulating neutrophils number, perhaps followed by the potential recruitment of these cells towards the affected tissues. However, the percentage of neutrophils in control mice also showed fluctuation, though not as significant when compared with the values in infected mice.

Relative to eosinophils after infection and reinfection there was always an initial increase in their percentage (two to four times the control mice), followed by a decrease to values observed in control group at day 35 in a similar way to what was observed for neutrophils. This may be the characteristic profile exhibited by eosinophils during an infection by *C. parvum*, since increased eosinophilia has also been identified as a hallmark of infection with parasites like *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. (Kasper and Buzoni-Gatel 2001, Male *et al.* 2006).

Relative to other cell populations, no significant variation was observed for monocytes among infected and control mice. In this context, it would be of interest to study if the monocytes express an activation marker (e.g. Gr-1⁺), which can be found in the mesenteric lymph nodes (MLNs) or lamina propria.

For B cells an increase was observed throughout the infection. However, between days 25 and 35, these values did not increase as observed in the values of the control group, probably related to T cell increase at these time points, which is more evident than the increase of B cells percentage.

NK cells values were higher in infected mice than in the control group. However, on day 35, we observed a percentage decrease in infected animals compared to the control group. Again, this difference might be related to T cell compartment within lymphocytes, which did not decrease in infected animals (51.7%) as occurred in control animals (30.94%). More conclusive results were not possible due to the lack of absolute counting values for these cell populations.

In this study, we decided to analyze the spleen of the infected mice since it is the organ of the lymphatic system that has been less studied in the context of an infection by *C. parvum* (mostly studied organs are Peyer's patches or mesenteric lymph nodes). In the spleen, the increase of CD4⁺ and CD8⁺ T cells one week after infection (day 7) and six days after reinfection (day 28), followed by its decrease, may be related to the establishment of the adaptive response upon which the protection against the infection depends. The low input presented by B cells may be related to the less important role of antibodies in this type of intracellular infection. Splenomegaly observed in mice challenged with *C. parvum* oocysts but not harboring pathogen developmental stages in the intestine is intriguing but probably the result of the increased cell proliferation. Considering the association of IgE with other extracellular parasites and the relevance of IgA in the mucosa of respiratory and digestive systems (Male *et al.* 2006), it would be important to study this type of humoral response in future studies.

The population of CD3⁺CD4⁺CD25^{high}, which is related to Treg cells, became progressively higher with time, and the values in the infected group were two times higher than the control group. In parasitic infectious diseases, as portrayed in an infection by *Schistosoma mansoni*, Treg cells may be induced in antigen-specific manner and may suppress tissue destruction resulting from immune responses (Watanabe *et al.* 2007). These authors showed that the percentage of circulating Treg cells was increased in some people infected with *S. mansoni*, and effective treatment decreased the levels of these cells. In the context of the present study, we hypothesized that the behavior of Treg cells may be similar, which needs to be proven in future studies and we would recommend using Foxp3 staining and/or IL-7R staining for a better discrimination between activated and Treg cells (Levings *et al.* 2006, Belkaid and Tarbell 2009).

There were no statistically significant differences among the mean values of infected and reinfected mice in most peripheral blood cell populations. However, it is interesting to notice that there was a greater variability after reinfection. In spite of the small sample size, and consequent *p*-values obtained (always greater than the chosen significance level), these findings allowed us to consider the hypothesis that this variability may be related to the fact that mice were older at PRI, and as such, the immune system was more mature. Although the age-related changes may be rather subtle, they may become very relevant during the course of the disease. This may explain the greater variability in the collected data after reinfection with oocysts of *C. parvum*. Additionally, some authors indicate that age should be considered in the selection of appropriate mouse models for immunological research (Pinchuk and Filipov 2008). This was one of the strongest reasons for choosing four-week-old animal model to understand how the immune system responds in the context of an infection by *C. parvum* since they are not yet in adulthood and the immune system is almost mature.

In spite of the numerous advances made in understanding the immune response to *C. parvum*, a significant amount of facts remains unknown. Limited information is available on the specific subset and function of the CD4⁺ cells that are required for protection against infection.

In conclusion, our data provides the first information about the evaluation of *C. parvum* specific cell-mediated response trends in immunocompetent mice. These results should be taken as a starting point for more deep studies to be performed with the main objective of understanding the role of innate immune response in the context of this infection in immunocompetent animals.

Acknowledgments. We would like to express our gratitude to Moussa Elbayoumy, MD, for critical review and linguistic editing. We are grateful to Glória Nunes from CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, for laboratory assistance. Vera Codices was supported by a PhD grant (SFRH/BD/46558/2008) from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal.

References

- Aguirre S.A., Mason P.H., Perryman L.E. 1994. Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, 62, 697–699.
- Alves M., Matos O., Antunes F. 2001. Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95, 627–632.
- Alves M., Matos O., Spano F., Antunes F. 2000. PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94, 291–297.
- Alves M., Xiao L., Sulaiman I., Lal A.A., Matos O., Antunes F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2744–2747. DOI: 10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003.
- Baecher-Allan C., Wolf E., Hafler D.A. 2005. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Clinical Immunology*, 115, 10–18. DOI: 10.1016/j.clim.2005.02.018.
- Banham A.H. 2006. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends in Immunology*, 27, 541–544. DOI: 10.1016/j.it.2006.10.002.
- Belkaid Y., Tarbell K. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual Review of Immunology*, 27, 551–589. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132723.
- Blanshard C., Jackson A.M., Shanson D.C., Francis N., Gazzard B.G. 1992. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Quarterly Journal of Medicine*, 85, 813–823.
- Borad A., Ward H. 2010. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiology*, 5, 507–519. DOI: 10.2217/fmb.09.128.
- Borrego L.M., Arroz M.J., Videira P., Martins C., Guimarães H., Nunes G., Papoila A.L., Trindade H. 2009. Regulatory cells, cytokine pattern and clinical risk factors for asthma in infants and young children with recurrent wheeze. *Clinical and Experimental Allergy*, 39, 1160–1169. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03253.x.
- Casemore D.P., Armstrong M., Sands R.L. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 1337–1341.
- Certad G., Ngouanesavanh T., Guyot K., Gantois N., Chassat T., Mouray A., Fleurisse L., Pinon A., Cailliez J.C., Dei-Cas E., Creusy C. 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infectious Agents and Cancer*, 21, 2–22. DOI: 10.1186/1750-9378-2-22.
- Current W.L., Garcia L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 325–358.
- Del Coco V.F., Córdoba M.A., Sidoti A., Santín M., Drut R., Basualdo J.A. 2012. Experimental infection with *Cryptosporidium parvum* IIaA21G1R1 subtype in immunosuppressed mice. *Veterinary Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.033>.
- Fayer R., Morgan U., Upton S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 1305–1322. DOI: 10.1016/S0020-7519(00)00135-1.
- Fayer R., Ungar B.L. 1986. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50, 458–483.
- Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4, 330–336. DOI: 10.1038/ni904.

- Glaberman S., Moore J.E., Lowery C.J., Chalmers R.M., Sulaiman I., Elwin K., Rooney P.J., Millar B.C., Dooley J.S., Lal A.A., Xiao L. 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 631–633. DOI: 10.3201/eid0806.010368.
- Gomez Morales M.A., Mele R., Ludovisi A., Bruschi F., Tosini F., Pozio E. 2004. *Cryptosporidium parvum*-specific CD4 Th₁ cells from sensitized donors responding to both fractionated and recombinant antigenic proteins. *Infection and Immunity*, 72, 1306–1310. DOI: 10.1128/IAI.72.3.1306-1310.2004.
- Kapel N., Benhamou Y., Buraud M., Magne D., Opolon O., Gobert J.G. 1996. Kinetics of mucosal ileal gamma-interferon response during cryptosporidiosis in immunocompetent neonatal mice. *Parasitology Research*, 82, 664–667. DOI: 10.1007/s004360050182.
- Kasper L.H., Buzoni-Gatel D. 2001. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infection and Immunity*, 69, 1–8. DOI: 10.1128/IAI.69.1.1-8.2001.
- Lean I.S., McDonald V., Pollok R.C. 2002. The role of cytokines in the pathogenesis of *Cryptosporidium* infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15, 229–234.
- Levings M.K., Allan S., d'Hennezel E., Piccirillo C.A. 2006. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Advances in Immunology*, 92, 119–155. DOI: 10.1016/S0065-2776(06)92003-3.
- Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 1701–1711. DOI: 10.1084/jem.20060772.
- Mac Kenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, 331, 161–167.
- Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I. 2006. Immunity to protozoa and worms. In: (Ed. Mosby Elsevier) *Immunology*. 7th. Canada, 277–297.
- Maloy K.J., Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunology*, 2, 816–822. DOI: 10.1038/ni0901-816.
- Mariotte D., Comby E., Brasseur P., Ballet J.J. 2004. Kinetics of spleen and Peyer's patch lymphocyte populations during gut parasite clearing in *Cryptosporidium parvum* infected suckling mice. *Parasite Immunology*, 26, 1–6. DOI: 10.1111/j.0141-9838.2004.00676.x.
- Matos O., Alves M., Xiao L., Cama V., Antunes F. 2004. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 2256–2257.
- McDonald V. 2000. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunology*, 22, 597–604. DOI: 10.1046/j.1365-3024.2000.00343.x.
- McDonald V., Bancroft G.J. 1994. Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Parasite Immunology*, 16, 315–320.
- McDonald V., Deer R., Uni S., Iseki M., Bancroft G.J. 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infection and Immunity*, 60, 3325–3331.
- Miller T.A., Schaefer F.W.3rd. 2007. Characterization of a *Cryptosporidium muris* infection and reinfection in CF-1 mice. *Veterinary Parasitology*, 144, 208–221. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.10.026.
- O'Garra A., Vieira P. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Medicine*, 10, 801–805. DOI: 10.1038/nm0804-801.
- Perryman L.E., Mason P.H., Chrisp C.E. 1994. Effect of spleen cell populations on resolution of *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Infection and Immunity*, 62, 1474–1477.
- Petry F., Jakobi V., Tessema T.S. 2010. Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Experimental Parasitology*, 126, 304–309. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.05.022.
- Pinchuk L.M., Filipov N.M. 2008. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immunity and Ageing*, 11, 5–11. DOI: 10.1186/1742-4933-5-1.
- Riggs M.W. 2002. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and Infection*, 4, 1067–1080. DOI: 10.1016/S1286-4579(02)01631-3.
- Theodos C.M. 1998. Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. *Advances in Parasitology*, 40, 87–119.
- Watanabe K., Mwinzi P.N., Black C.L., Muok E.M., Karanja D.M., Secor W.E., Colley D.G. 2007. T regulatory cell levels decrease in people infected with *Schistosoma mansoni* on effective treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 676–682.
- Waters W.R., Harp J.A. 1996. *Cryptosporidium parvum* infection in T-cell receptor (TCR)- α - and TCR- δ -deficient mice. *Infection and Immunity*, 64, 1854–1857.
- Wyatt C.R., Brackett E.J., Perryman L.E., Rice-Ficht A.C., Brown W.C., O'Rourke K.I. 1997. Activation of intestinal intraepithelial T lymphocytes in calves infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity*, 65, 185–190.
- Xiao L., Alderisio K.A., Jiang J. 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: effect of the number of samples and analytic replicates on test results. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5942–5947. DOI: 10.1128/AEM.00927-06.
- Xiao L., Fayer R. 2008. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38, 1239–1255. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.03.006.
- Xiao L., Feng Y. 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52, 309–323. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x.
- Xiao L., Ryan U.M. 2008. Molecular epidemiology. In: (Eds. R. Fayer and L. Xiao) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL, 119–171.

(Accepted October 30, 2012)

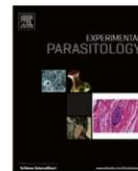
Author's copy

Capítulo 4

Dynamics of cytokines and immunoglobulins serum profiles in primary and secondary *Cryptosporidium parvum* infection: Usefulness of Luminex[®] xMAP technology

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

CODICES, V., MARTINS, C., NOVO, C., DE SOUSA, B., LOPES, A., BORREGO, M. & MATOS, O. 2013. Dynamics of cytokines and immunoglobulins serum profiles in primary and secondary *Cryptosporidium parvum* infection: Usefulness of Luminex[®] xMAP technology. *Exp Parasitol*, 133, 106-13.



Dynamics of cytokines and immunoglobulins serum profiles in primary and secondary *Cryptosporidium parvum* infection: Usefulness of Luminex® xMAP technology

Vera Codices^a, Catarina Martins^b, Carlos Novo^{b,c}, Bruno de Sousa^d, Ângela Lopes^e, Miguel Borrego^b, Olga Matos^{a,*}

^a Unidade de Parasitologia Médica, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, CMDT, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 1349-008, Portugal

^b Centro de Estudos de Doenças Crônicas, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 1169-056, Portugal

^c Unidade de Parasitologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 1349-008, Portugal

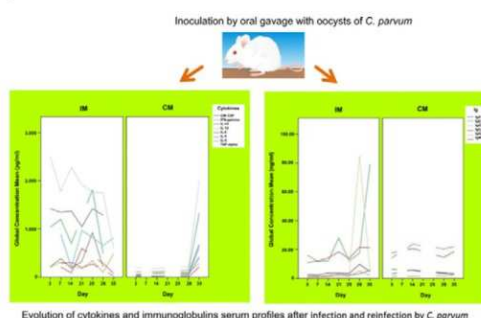
^d Unidade de Saúde Internacional e Bioestatística, CMDT, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 1349-008, Portugal

^e Formerly Unidade de Tecnologias de Proteínas e Anticorpos Monoclonais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 1349-008, Portugal

HIGHLIGHTS

- ▶ Immune mediators' serum profiles in immunocompetent: key-point in *C. parvum* infection.
- ▶ Significant changes of IgG1 and IgG2a during *C. parvum* infection.
- ▶ Th₁ predominate over Th₂ response, with increased production of TNF- α and IFN- γ .
- ▶ Luminex® vs ELISA: greater sensitivity with a small sample volume.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2012

Received in revised form 5 November 2012

Accepted 7 November 2012

Available online 20 November 2012

Keywords:

Luminex® xMAP
Cryptosporidium parvum
Cytokine
Immunoglobulin

ABSTRACT

Infection by *Cryptosporidium parvum* triggers a complex array of innate and adaptive cell mediated immune response, playing an important role in controlling the infection. To date, there are no studies applying the Luminex® xMAP technology to determine profiles of cytokines and immunoglobulins in the context of an infection by *C. parvum*. In this study, we analyzed these immune mediators in the serum of immunocompetent mice inoculated with *C. parvum* oocysts, using Luminex, to understand how the immune system responds to an infection by this parasite. Animal sera were also analyzed by ELISA to determine the expressed immunoglobulin isotype profile, and compare the obtained trend with data obtained by Luminex. Specific-pathogen-free BALB/C mice were inoculated with oocysts of *C. parvum* at days 0 and 22. Peripheral blood was aseptically collected from sacrificed mice on several time points, and immune mediators were evaluated in serum samples. Infection was confirmed by the presence of *C. parvum* DNA in feces by a nested-PCR assay (60-kDa glycoprotein). Luminex results showed predominance in the secretion of IgG1 and IgG2a, confirmed by ELISA, which also showed that IgG1 is the major immunoglobulin isotype produced during the infection. The analysis of cytokines suggests a preferential Th₁ over the Th₂ response, with increased production of TNF- α , IFN- γ and GM-CSF. This work contributed

* Corresponding author. Address: Unidade de Parasitologia Médica, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, CMDT, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 100, 1349-008 Lisboa, Portugal. Fax: +351 212632105.

E-mail address: omatos@ihmt.unl.pt (O. Matos).

to a better understanding of the immune response to the infection by *C. parvum*, as well as demonstrated the advantage of Luminex® xMAP technology to study immune mediators, using small sample volumes.
© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cryptosporidium parvum is a commonly occurring protozoan parasite of the gastrointestinal tract and has been identified as the agent responsible for numerous outbreaks of diarrheal illness. This infection is self-limiting in immunocompetent hosts but can become severe in young or immunodeficient hosts, such as patients with AIDS, causing chronic and life-threatening diarrhea (Nichols, 2008; Okhuysen et al., 1998). Patterns of *C. parvum* infection are determined by the balance between the host's immunity and parasite characteristics, such as size of inoculum, oocyst viability/infectivity and genotype (Fayer et al., 2000).

Since there is no effective therapeutic agent with anticryptosporidial activity, a deeper understanding of the immune response to the parasite may facilitate the development of such therapeutic agent. It is understood that the initial innate responses serve to limit parasite number, but the clearance of infection ultimately requires a cell-mediated immune response (McDonald and Bancroft, 1994; Ungar et al., 1991). The nature of an acquired immune response to any infection is mostly determined by the balance between T helper 1 (Th₁) and T helper 2 (Th₂) phenotypes. Th₁ lymphocytes are involved in cellular immune responses, mainly through the production of interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-2 and IL-12, and are particularly effective in the response against intracellular infections. Th₂ cells are involved in the development of humoral immune responses by producing IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (Melinceanu et al., 2009). These Th₂ cells are mainly involved in immune responses to parasites and allergic responses.

The most likely source of IFN- γ is natural killer (NK) and Th₁ cells, stimulated by IL-12 and TNF- α , and negatively regulated by IL-10. IFN- γ is a proinflammatory cytokine, involved in the synthesis of immunoglobulin (Ig)G2a (B cells) and inhibition of Th₂ cell growth. IFN- γ has been shown to be the key cytokine in both the innate and the adaptive immunity during *C. parvum* infection in knockout, SCID and neonatal mice (Kapel et al., 1996; Petry et al., 2010; Tessema et al., 2009).

IL-10 is a suppressive cytokine produced by regulatory T cells, associated with downregulation of IFN- γ synthesis by NK cells (Murphy et al., 2008) and is implicated in the downregulation of the expression of co-stimulatory molecules involved in the immunopathology during *Toxoplasma gondii* infection (Villegas et al., 2000).

IL-12 is expressed when a Th₁ response develops during a primary *C. parvum* infection. In mice, it stimulates NK cells to secrete large amounts of IFN- γ (required for early parasite clearance), acting synergistically with TNF- α for the production of nitric oxide (NO) (Urban et al., 1996).

IL-2 is mainly involved in T cell proliferation. It also activates NK cells and stimulates B lymphocytes proliferation. IL-4 is involved in activation of IgG1 and IgE as well as MHC class II induction. IL-5 is involved in IgA synthesis as well as eosinophils production. GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) is a hematopoiesis-related cytokine that promotes myelopoiesis and B cells differentiation (Murphy et al., 2008). This study aimed to explore the importance of these immune mediators in infection and reinfection by *C. parvum* in immunocompetent mice.

C. parvum infection is accompanied by an antibody-mediated Th₂ response in infected individuals with production of parasite-specific Ig (Lean et al., 2002; Peeters et al., 1992; Ungar et al.,

1986). Several studies have been done to investigate Th₁ and Th₂ cytokine response to an infection by *C. parvum*. The main conclusion indicates that both Th₁ and Th₂ cytokines act in a well regulated mechanism for an effective control of *C. parvum* infection (Ehigiator et al., 2005; Huang et al., 1996; Singh et al., 2005; Tessema et al., 2009). Following this idea, McDonald (2000) concludes that there is a strong early Th₁ response and a more balanced response later with a Th₂ component to facilitate parasite removal. Susceptibility or resistance to infection correlates with the ability to produce characteristic panels of cytokines and Ig.

Microsphere-based suspension array systems, based on Luminex xMAP technology, offer a high-throughput platform, capable of performing a variety of immunoassays on the surface of fluorescence-coded beads (Datta and Opp, 2008). To date, there are no studies applying the Luminex technology to determine profiles of cytokines and Ig in peripheral blood during *C. parvum* infection. Considering the limitations in sample volumes when studying small animal models, this multiplex technology may be a very efficient platform for the characterization of immune mediators in these conditions.

Thus, the aim of this study was to analyze immune mediators in serum of mice inoculated with *C. parvum* oocysts, in order to understand how an immunocompetent system responds to an infection by this parasite. Luminex technology was used to determine the profiles of serum cytokines and Ig. For confirmation purposes, Luminex results were confirmed by those of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

2. Materials and methods

2.1. Mice

Four-week-old female BALB/C ByJ mice were obtained from Charles River Laboratories (France). All mice were housed in separate sterilized plastic cages with filter top, and fed with sterilized food and water (pH3.5) *ad libitum* under SPF conditions.

2.2. Infection studies

Purified oocysts of *C. parvum* (Morendun) obtained from cattle were purchased from Creative Science Company/Morendun Institute (Edinburgh, Scotland). According to the supplier, oocysts were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and stored at 4 °C in the presence of antibiotics (penicillin and streptomycin). The viability of the oocysts preparation, checked by *in vitro* excystation, was 94.7%.

Seven groups of three animals each were inoculated with 1×10^6 *C. parvum* oocysts in 80 μ l of PBS per mouse by oral gavage. Four groups of three mice were gavaged with PBS and used as control. A group of mice was sacrificed on days 3, 7, 14 and 21 post infection (PI). In order to analyze the mechanisms conferring resistance towards infection with *C. parvum*, a rechallenge with 1×10^6 oocysts in 80 μ l of PBS per mouse was performed at day 22 PI. On days 25, 28 and 35 PI (respectively, 3, 6 and 13 days post reinfection [PRI]) a group of mice was sacrificed. In each time point, fecal and blood samples were collected for analysis. The presence of *C. parvum* DNA in feces was confirmed by a nested-PCR of the 60-kDa glycoprotein (GP60) gene (Alves et al., 2003; Glaberman et al., 2002) after extraction of DNA by a Mini-BeadBeater/silica method (Alves et al., 2001). The presence of oocysts in feces was

determined in fecal smears stained by a modified Ziehl–Neelsen method (Casemore et al., 1985) after oocyst concentration using a modified water–ether sedimentation method (Alves et al., 2000) and then observed under an optical microscope with 400× magnification. All experiments involving animals were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines.

2.3. Serological studies

2.3.1. Luminex xMAP technology assay: determination of immune mediators

Peripheral blood was aseptically collected from mice sacrificed at each time point. Sera were separated after centrifugation and stored at –20 °C until analysis. In this study, the Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Th₁/Th₂ Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) was used to quantify mouse IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 (p70), GM-CSF, IFN-γ and TNF-α. The Milliplex® MAP Mouse Immunoglobulin Isotyping kit (Millipore Corporation, MA, USA) was used to quantify mouse immunoglobulins in serum, including IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, and IgM. The assays were performed according to the manufacturer's protocol.

All buffers and diluents were warmed to room temperature prior to use. Eight standard control reagents needed for the calibration curves, were provided in the kit and were reconstituted using 500 µL of sample diluent (for cytokines assay) and 500 µL of assay buffer (for immunoglobulins assays), and prepared as stock solutions, according to the manufacturer's recommended procedures. For each cytokine assay, a calibration curve is needed, based on the eight standard control reagents. Serial dilutions from the standard stock were performed to achieve two 8-point standard curves, one for Low Photomultiplier (PMT) and one for High PMT. For immunoglobulins assay, a 7-point standard curve was used. For each assay, a blank buffer sample was also evaluated.

2.3.1.1. Mouse serum cytokines. The manufacturer's recommended procedures were followed to use 12.5 µL of serum in each well. General practices included keeping reagents on ice until use, minimizing exposure of the beads to light by wrapping tubes and microplates with aluminum foil, and performing appropriate agitation on a microplate shaker (initial agitation at 1100 rpm for 30 s, and then reduced to 300 rpm for 30 min, at room temperature).

After completion of all steps in the assay, the plates were read twice (one time for High PMT standard curve, and another for Low PMT standard curve) in the Athena MultiLyte – Luminex 200 System, and data were analyzed with the BioPlex 5.0 software with a five-parameter logistic regression (5PL) curve fitting. For each curve, the software evaluated the goodness-of-fit for each point.

All standard points accepted for the standard curves were within an interval of 70–130% of the expected values, as recommended (Nix and Wild, 2005). All standard and serum samples were analyzed in duplicate, and results given in pg/ml according to the respective standard curve. For statistical purposes, results considered for each sample were the mean values of the duplicates.

2.3.1.2. Mouse serum immunoglobulins. The manufacturer's recommended procedures were followed to use 5 µL of serum in each well. Technical guidelines included keeping reagents on ice until use, performing all washes with the assay buffer provided, minimizing exposure of the beads to light by covering the tubes and microplates with aluminum foil, using appropriate agitation on a titer plate shaker (600 rpm for 10 min at room temperature), keeping the bottom of the microtiter filter plate clean by blotting on paper towels and removing the fluid between each wash by vacuum filtration. Plates were read in the Athena MultiLyte – Luminex 200 System, and data were analyzed with the BioPlex 5.0 software with

a five-parameter logistic regression (5PL) curve fitting. For each curve, the software evaluated the goodness-of-fit for each point.

All standard points accepted for the standard curves were within an interval of 70–130% of the expected values, as recommended (Nix and Wild, 2005). All samples were analyzed in duplicate, and results given in ng/ml according to the respective standard curve. For statistical purposes, results considered for each sample were the mean values of the duplicates.

2.3.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The Mouse Mono Ab-ID Kit (Zymed Laboratoires Inc., South San Francisco, CA, USA) was used to assess mouse immunoglobulins in serum (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, and IgM). The assay was performed according to some adjustments made to the manufacturer's protocol. Microtiter plates (96-well, Nunc-Immuno™ Plate Polysorp, USA) were coated overnight at 4 °C with Goat Anti-Mouse IgG + IgA + IgM by adding 100 µL into each well. Coated plates were washed once with PBS-T (0.05% Tween 20-PBS) and blocked with 3% Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) in PBS for 1 h at room temperature. After another wash, diluted sera (1:100 in PBS) were added, and the plates incubated for 1 h at 37 °C. After three washes with PBS-T, the Rabbit Anti-Mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (γ-chain specific), IgM (μ-chain specific), and IgA (α-chain specific) antibodies (diluted 1:5 in PBS/T) were added to the respective well and incubated for 1 h at 37 °C. Three washes were made with PBS/T and 100 µL of Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate (Sigma, St. Louis, USA) diluted 1:10,000 in PBS/T were added to each well and incubated for 1 h at 37 °C in the dark. Plates were washed five times with PBS-T, and a substrate solution containing 1-2-Phenylendiamine (Sigma, St. Louis, USA), hydrogen peroxide 30% v/v and citrate/PBS buffer were added. After 30 min of a final incubation at room temperature, the optical density was measured at 405 nm in an ELISA microplate reader (NanoQuant Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, CH). As control for plate-to-plate variation, a known *Cryptosporidium* spp. positive serum sample and a blank were run in parallel on each plate. All samples were run in duplicate. *C. parvum* crude soluble extract was prepared by sonication of oocysts with few modifications to the method described by Snelling et al. (2007). Briefly, oocysts were solubilized (30 min at 4 °C) in lysis buffer and stored at –80 °C. Upon thawing, samples were sonicated with 20 pulses of 1-min (80%, 2 cycles; 60%, 4 cycles) on ice at 1-min intervals and subsequently ultracentrifuged at 4 °C (20,000g for 30 min) to separate the soluble and insoluble fractions. The soluble fraction was used as crude soluble antigen of *Cryptosporidium* and protein concentration determined by Bradford's method. Serum IgG, IgM and IgA responses to *Cryptosporidium* antigen were detected by Indirect ELISA based on the protocol of Kaushik et al. (2009).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann–Whitney test, since the data did not meet the criteria of normality and homogeneity of variance necessary to apply the *t*-test. Statistical significance of differences among the values of the immune mediators analyzed was defined by a *p*-value of less than 0.05. Tests were performed using IBM SPSS Statistics version 19 software (SPSS Inc., Chicago, USA).

3. Results

3.1. Infectivity assay

Fecal samples were collected from each group of mice on days 3, 7, 14, 21, 25, 28, and 35 PI. The occurrence of oocysts in feces

was determined in fecal smears stained by a modified Ziehl–Neelsen method, after oocyst concentration, followed by observation under an optical microscope with 400× magnification. Although the load of oocysts was low, they could be observed on days 3 and 7 PI. The presence of gDNA of *C. parvum* in feces was determined by a nested-PCR of the 60-kDa glycoprotein gene, and it was successfully amplified on days 3, 7 and 14 PI. Feces from control mice were analyzed in all time points, by microscopy and nested-PCR, in duplicate, and were all negative.

3.2. Serological studies

3.2.1. Mouse serum cytokines

The balance between Th₁ and Th₂ cytokine responses to infection was monitored. The results obtained for each Th₁ (IFN-γ, TNF-α, IL-2 and IL-12) and Th₂ (IL-4, IL-5 and IL-10) cytokines, and hematopoiesis-related cytokines (GM-CSF), are described in Fig. 1.

In general, during the primary infection period (Fig. 1) all the circulating cytokines were increased in infected mice when compared to control mice. The data suggest predominantly a Th₁ response in infected mice, with a more pronounced increase in the production of immune mediators TNF-α and IFN-γ, and the hematopoiesis related cytokine (GM-CSF). At day 3 PI, values were higher in infected mice ca. 12, 10 and 36 times, for TNF-α (IM: 2505.52 vs CM: 204.53 pg/ml), IFN-γ (IM: 1038.66 vs CM: 107.83 pg/ml) and GM-CSF (IM: 1425.00 vs CM: 39.82 pg/ml), respectively, when compared to those observed in the control group. On day 3 PI, the cytokines IL-2 and IL-12 presented similar values to the respective control mice. IL-5 values displayed in infected mice were 29 times higher than control mice (IM: 889.29 vs CM: 30.79 pg/ml) at day 7. IL-10 mean value in infected mice was almost eight times higher

than the respective control, at day 3 PI (IM: 215.09 vs CM: 28.37 pg/ml).

Between days 3 and 22 PI, all cytokines fluctuated in their concentration mean values.

Reinfection occurred on day 22. Three days later, at day 25, the majority of immune mediators increased and exhibited a peak: IL-2 (275.37 pg/ml), IL-12 (343.08 pg/ml), IFN-γ (1814.43 pg/ml), IL-10 (929.33 pg/ml), and GM-CSF (1425.00 pg/ml). On day 28 PI, these mediators showed a marked decrease until the end of the study (day 35), except IL-12 and IL-5, whose concentrations rose again between days 28 and 35. Reinfection did not affect the descending slope of TNF-α and IL-4.

3.2.2. Mouse serum immunoglobulins

Immunoglobulin secretion was monitored with Luminex technology, in both infected and non-infected control mice. The results obtained for each immunoglobulin analyzed (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, and IgM) are described in Fig. 2.

Between days 3–21, IgG1 and IgM were the most predominant Ig (Fig. 2). The levels of both Igs peaked at day 21. After reinfection at day 22, IgM slightly decreased its value and increased again between days 25 and 28. During the same period, there was a visible increase in secretion of immunoglobulins G and M, but not A. A marked increase in IgG2a secretion was observed after day 25 PI. From day 28 to day 35 PI, IgG2a in circulation decreased to basal levels (similar to control mice) with a parallel increase of IgG1. A small peak was observed in the levels of IgG2b and IgG3 in infected mice at day 28 PI when compared to control mice.

IgG1 and IgG2a were the subclasses with significant changes post infection.

The production of serum IgG, IgM and IgA isotypes in response to *Cryptosporidium* antigen were also analyzed by indirect ELISA. These data are presented in Tables 1 and 2.

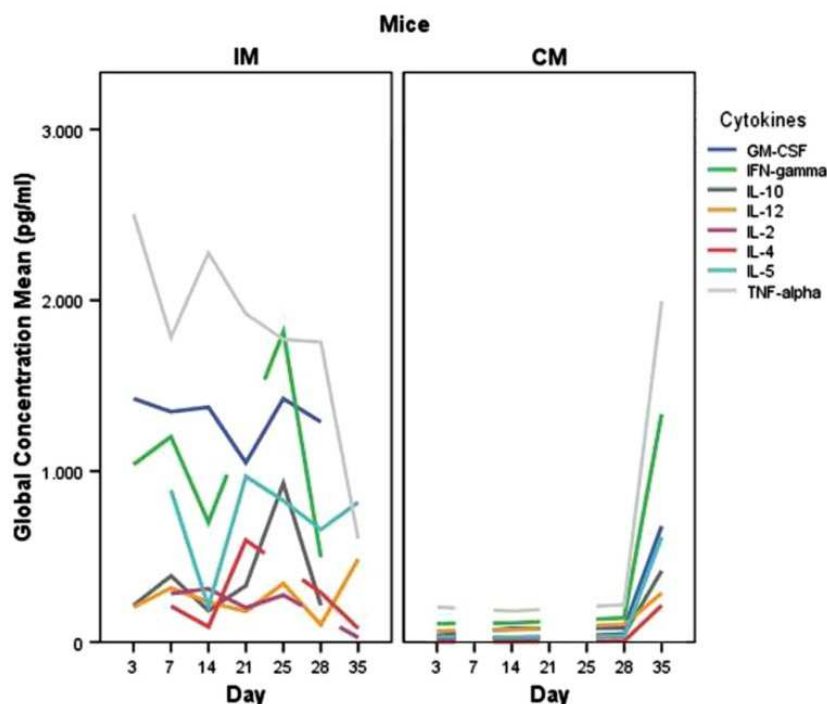


Fig. 1. Cytokine levels during infection and reinfection, in infected and non-infected control mice. Graphics show the variability in data obtained from the analysis of cytokines in sera, during the study period (35 days). Cytokines were assessed by Luminex® xMAP technology and results presented are mean values obtained from all mice sacrificed at each time point. IM – infected mice and CM – control mice.

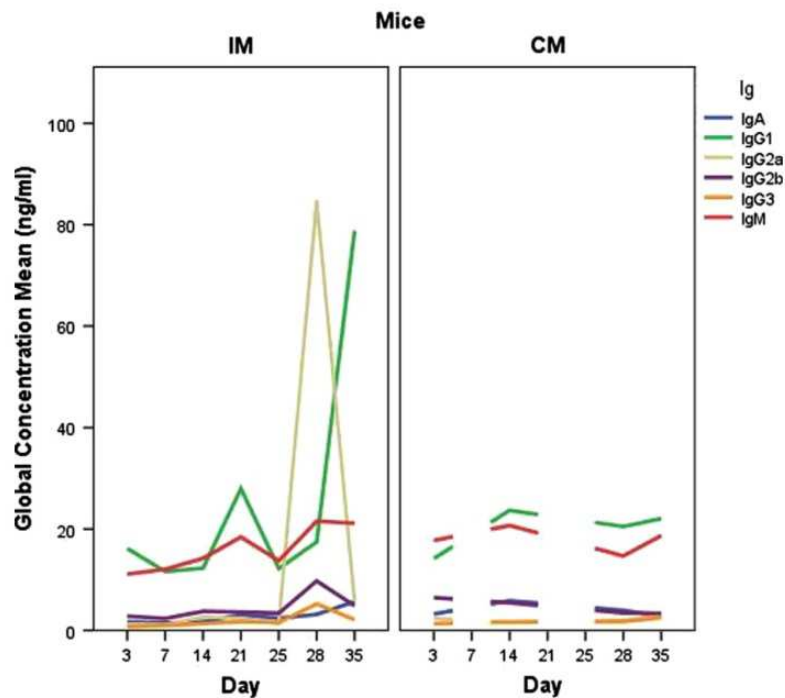


Fig. 2. Immunoglobulin levels during infection and reinfection, in infected and non-infected control mice. Graphics show the variability in data obtained from the analysis of immunoglobulins in sera, during the study period (35 days). Immunoglobulins were determined by Luminex® xMAP technology and the results presented are mean values obtained from all mice sacrificed at each time point. IM – infected mice and CM – control mice.

IgG were found to be the main circulating immunoglobulins during infection and reinfection followed by IgA and IgM. After reinfection on day 22, a slight increase in the proportion of IgG (63.50%) and a slight decrease in the percentages of IgA (20.43%) and IgM (16.07%) were observed. Generally, comparing these results with data obtained by Luminex technology, they agree in the measurements of IgG but not those of IgM and IgA (Luminex: IgG > IgM > IgA; ELISA: IgG > IgA > IgM).

The main isotype during the whole period of infection and reinfection was IgG1, which was also confirmed by Luminex. For the other subclasses, their levels came in this order IgG2b > IgG2a > IgG3. In the reinfection period (after day 22), data from ELISA showed an increase of IgG2a at day 28 (33.03%) and its decrease until day 35, which was also observed with Luminex. For other subclasses, no significant changes were observed with ELISA.

3.3. Statistical analysis

No statistically significant differences were observed for cytokines among the mean values before and after reinfection. The analysis of data obtained with Luminex before and after reinfection, showed that the values of IgG2a ($p = 0.029$) and IgG3 ($p = 0.002$) were statistically significant. For ELISA, no statistically significant values were obtained.

4. Discussion

To our knowledge, this study is the first that aims to understand how the immune system responds to an infection by *C. parvum* in immunocompetent mice, using Luminex xMAP technology. *C. parvum* is mainly an intestinal parasite, whose infection may induce changes in the immune system in order to overcome the infection,

Table 1

Total immunoglobulin isotypes in serum samples of *C. parvum* infected mice, determined by ELISA, during infection and reinfection processes (35 days). The values in the second column (Total Ig) refer to the mean value of the absorbance read for all immunoglobulin isotypes (G, A, M) for each time point. The third, fourth and fifth columns represent, respectively, the percentage of each isotype relative to the Total Ig, for all time points.

Day	Total Ig	% IgG	% IgA	% IgM
3	1.7997	59.39	26.02	14.59
7	2.0141	55.94	27.05	17.02
14	1.1258	57.05	23.91	19.05
21	1.6691	59.42	23.57	17.01
22	Reinfection			
25	0.2841	63.50	20.43	16.07
28	1.9158	62.95	23.03	14.02
35	2.4630	60.75	23.79	15.46

Table 2

Total immunoglobulin G subclasses in serum samples of *C. parvum* infected mice, determined by ELISA, during infection and reinfection processes (35 days). The values in the second column (Total IgG) refer to the mean value of the absorbance read for the all immunoglobulins with isotype G for each time point. The third, fourth, fifth and sixth columns represent, respectively, the percentage of IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 subclasses in Total IgG, for all time points.

Day	Total IgG	% IgG1	% IgG2a	% IgG2b	% IgG3
3	1.0689	43.63	19.07	26.83	10.47
7	1.1266	42.47	20.32	25.22	11.99
14	0.6422	52.84	17.81	20.67	8.68
21	0.9917	47.23	19.01	21.71	12.05
22	Reinfection				
25	0.1804	38.55	15.28	20.37	25.79
28	1.2059	33.44	33.03	20.34	13.19
35	1.4962	38.60	21.10	24.06	16.24

and that may be reflected in the production of immune mediators. Although cytokines and immunoglobulins are produced in small quantities, the variations in their levels might allow the establishment of a characteristic profile related to infection by *C. parvum*.

Due to their low serum concentrations, a method capable of detecting subtle changes on their production is needed. Also, small sample volumes are often available for study, requiring a methodology capable of performing the quantification of cytokines and Ig in very small volumes. The characteristics of multiplex platforms concerning volume of sample, high sensitivity, specificity and reproducibility, justify our choice for the use of Luminex technology in this work (despite being an expensive technique due to the high prices of the kits). Moreover, due to the small volume of serum sample needed, Luminex may be valuable for the study of infection in neonatal mice, which are commonly used for *Cryptosporidium* immunology.

In previous studies with this parasite using the same animal model but different techniques (Kapel et al., 1996; Mariotte et al., 2004), infection was not monitored beyond 27 days. So, in this work, using Luminex xMAP technology to study the profiles of the immune mediators, we decided to monitor the infection for a longer period of time (35 days) with seven time points and a higher inoculum of oocysts (1×10^6), instead of increasing the number of mice.

Due to the high amount of administered inoculum by oral gavage to mice, it would be expected to find a large amount of oocysts in feces, which did not occur. Our data showed that the onset of parasite shedding was low and only detectable by microscopy on days 3 and 7 PI. The presence of DNA of *C. parvum* in feces was detected on days 3, 7 and 14 PI. Such events might be due to the fact that inoculated oocysts have undergone excystation or have been destroyed during the normal gut transit. In contrast to humans, who are susceptible to infection throughout life, animals including mice develop resistance to infection after the neonatal period. Although basically most previous studies have been done on neonatal or immunocompromised mice, we considered it important to determine what occurs in the immunocompetent animals because this type of infection also takes place in immunocompetent persons.

In this study, an increase in cytokine secretion was found in infected mice when compared to non-infected control mice, indicating that infected mice were attempting to overcome the infection. The immune response appeared to be mainly a Th₁ response, as increased expression of the immune mediators TNF- α and IFN- γ during the infection was observed; this finding is in accordance with that of other authors (McDonald, 2000). These cytokines might allow Th₁ cells to be particularly effective in protecting against intracellular infections, such as infection by *C. parvum* (Lean et al., 2002; Petry et al., 2010). Although IFN- γ has been shown to play an important role in both the innate and adaptive immune responses to *C. parvum*, the mechanisms of resistance mediated by this cytokine alone are not completely understood. What is known is the contribution of IL-12 as a powerful cytokine in inducing IFN- γ synthesis by T cells and NK cells, as well as in mediating resistance to various intracellular protozoa (Barakat et al., 2009; Urban et al., 1996).

Different studies indicate the crucial role of IFN- γ , TNF- α and IL-12 as well as NO in host resistance to infection with another parasite, *Trypanosoma cruzi* (Aliberti et al., 1996; Cardillo et al., 1996). We describe the synthesis of proinflammatory cytokines that may initiate the production of IFN- γ by NK cells. IFN- γ combined with TNF- α activate macrophages to produce high levels of NO and IL-12, which are primarily responsible for the control of parasite replication during the acute phase of infection.

After infection and reinfection, the levels of both IL-10 and IFN- γ were significantly increased. The faster increase after reinfection

may be explained by the presence of memory cells developed after the primary infection, which may be reactivated upon reinfection, and secrete higher quantities of cytokines in short periods of time. Eventually, the peak of IL-10 overlaps with that of IFN- γ . Since IL-10 has been shown to inhibit IFN- γ mediated inflammatory response by macrophages against *T. gondii*, its rise in the level may also limit the inflammatory response against *C. parvum*. Once more, the delicate balance between Th₁ (to control parasite growth) and Th₂ cytokines (to limit pathology) is in agreement with that reported by other authors (Lean et al., 2002; Tessema et al., 2009).

For GM-CSF and IL-12, it was found that the events that occurred 3 days after reinfection mimic, in some way, those that occurred 3 days after infection. The increase in the amount of secreted IL-12 after reinfection is expected, as the increase in IFN- γ would lead to a rise in IL-12 production.

The peak secretion of IL-4 and IL-5 occurred later during infection, at day 21 PI. Both cytokines are Th₂, related to IgE activation and IgA synthesis, respectively, in response to parasite infection. This antibody response observed during *C. parvum* infection might be of minor importance since it rises mainly in response to the exposed antigens of the extracellular stages of the parasite (Petry et al., 2010). Davami et al. (1997), although in other context and with a different protocol (evaluation of cytokines in culture supernatants of spleen cells incubated with parasite antigen vs serum cytokines), also reported increased secretion of IL-4 at day 21 in BALB/C susceptible mice. These authors suggested that IL-4 production at this point in the infection might hinder the development of immunity. According to Heinzel (1994), this negative effect could be due to suppression of the induction of a Th₁ response. However, in our study, as well as in the study by Davami et al. (1997) the levels of Th₁ cytokines did not suffer significant changes. Considering this data, in *C. parvum* infection, IL-4 may inhibit Th₁ effector mechanisms, instead of inhibiting the production of Th₁ cytokines. Nevertheless, the effective role of IL-4 is still unclear, as more recent studies reported no increased susceptibility to *C. parvum* infection in C57BL/6 IL-4 knockout mice (Campbell et al., 2002). According to Enriquez and Sterling (1993), the peak secretion of IL-5 at day 21 might be related to the protective role of this cytokine against *C. parvum*, which combined with IL-4 appears to be an important Th₂-dependent mechanism for controlling this infection.

The increases of IL-12 and IL-5 in infected mice between days 28 and 35, suggest that both Th₁ and Th₂ cell types participate in long term immunological response.

Immunoassays for cytokines in serum and blood are complex. Cytokines may interact with blood proteins, including autoantibodies and soluble and membrane-bound receptors, rendering a fraction of cytokines undetectable. In this study, at day 35 PI, a significant increase for the majority of cytokines studied (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 and GM-CSF) was observed in control mice, compared with infected mice. It is not possible that the control mice had become infected by day 35, since their feces were analyzed in all time points (including day 35), by microscopy and nested-PCR, and were all negative. It is notable that we considered the possibility of the Luminex equipment malfunction resulting in the elevation of all cytokines by day 35 in the control mice. However that was contradicted by the fact that the same equipment was used at the same time to analyze the cytokines levels for infected mice and functioned normally. In addition, control mice were under SPF conditions, in separate sterilized cages from infected ones, and manipulation of controls were always performed first, with all due care practiced regarding handling to avoid cross contamination (using new gloves and sterilized material to collect feces). Thus, we hypothesize that such changes may be related to intrinsic features of each animal (age and maturation of the immune system). Due to

the small number of animals in the study, further studies are necessary to confirm the specificity of the observed changes in the context of the infection by *C. parvum*. However, this study has determined the tendency of the Th₁/Th₂ response during an infection by *C. parvum* in immunocompetent mice, using small sample volumes.

Some literature suggests that multiplex bead array assays are generally comparable to ELISA with respect to sensitivity and reproducibility (Khan et al., 2004; Pickering et al., 2002). In general, the data from ELISA and Luminex in this study, showed a predominance in the production of IgG1, after *C. parvum* infection. Moreover, the data suggest that the course of infection was similar to a typical antibody response.

The data obtained with Luminex showed that the primary infection is characterized by a slight increase in the production of IgM, followed by an IgG response (IgG1). The study on the secondary antibody response revealed the production of relatively small amounts of IgM antibody and much larger amounts of IgG, namely IgG2a. This peak production of IgG2a might be related to the main function of this class of antibody, namely neutralization of pathogens, and augmentation of the production of IFN- γ which preferentially induces IgG2a production. In other words, the response of the innate immune system to the parasite helped to initiate the adaptive immune response, in a more vigorous and faster way, which is also consistent with that reported by other investigators (Jakobi and Petry, 2008; Murphy et al., 2008). In control mice, the values of these immunoglobulins remained constant during the same period (data not shown). In ELISA, the initial response was shown to be IgG, followed by IgA and then IgM. This finding was slightly different from that of Luminex (IgG > IgM > IgA), perhaps due to differences in sensitivity between the two techniques.

Results of techniques showed pronounced changes in the secretion of almost all immunoglobulins, except for IgA, between days 25 and 28 PI. This is conceivable as IgA is preferably made in the mucosa of respiratory and digestive systems, so its serum level is very low.

One week after reinfection (day 28), IgG2a and IgG1 exhibited opposite tendencies in their secretions, with the levels of IgG2a decreased and those of IgG1 increased. This variation is possibly linked to the function of these antibodies, as IgG1 is more efficient in pathogens opsonization and IgG2a in their neutralization. In ELISA, however, the variation in these two Ig was not noticeable, which may be due to the fact that this method is less sensitive than Luminex.

Despite the changes in immunoglobulin secretion, there were no visible signs and symptoms in mice consistent with disease, like diarrhea, dehydration, weight loss or asthenia. The objective in applying two techniques (Luminex and ELISA) to the same serum samples was to compare the profile of Ig secretion during infection with both assays. In both methods IgG1 was shown to respond first to infection.

For cytokines, the *p*-values obtained in each hypothesis test were always greater than the chosen significance level (5%), which may be due to the small number of observations in each group of animals. The two statistically significant results obtained for IgG2a and IgG3 with Luminex suggests that this technique is more sensitive than ELISA. Although not all results are statistically significant, the obtained results could serve as guidelines for future studies on the immune response to *C. parvum* in immunocompetent populations.

Considerable advances have been made in the understanding of the host responses to *Cryptosporidium*, including immune effector mechanisms that control infection, although there are still important gaps in the study of immune mediators. Our work provides preliminary information in this context, supporting the role of IFN- γ and TNF- α as the key cytokines in both innate and adaptive

immunity during primary and secondary *C. parvum* infection. This work demonstrated that IgG1 is the major immunoglobulin isotype produced during an infection with *C. parvum*. Although ELISA is considered the gold standard for protein quantification, the Luminex® xMAP technology is more sensitive and allows analysis of small amounts of immunoglobulins and cytokines from a small volume of sample.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Moussa Elbayoumy, MD, for critical review and linguistic editing. We thank Amélia Bastos and Glória Nunes from CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, for helpful laboratory assistance. Vera Codices was supported by a Ph.D. Grant (SFRH/BD/46558/2008) from Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

References

- Aliberti, J.C., Cardoso, M.A., Martins, G.A., Gazzinelli, R.T., Vieira, L.Q., Silva, J.S., 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64, 1961–1967.
- Alves, M., Matos, O., Spano, F., Antunes, F., 2000. PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 291–297.
- Alves, M., Matos, O., Antunes, F., 2001. Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 627–632.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2744–2747.
- Barakat, F.M., McDonald, V., Foster, G.R., Tovey, M.G., Korbel, D.S., 2009. *Cryptosporidium parvum* infection rapidly induces a protective innate immune response involving type I interferon. *J. Infect. Dis.* 200, 1548–1555.
- Campbell, L.D., Stewart, J.N., Mead, J.R., 2002. Susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infections in cytokine- and chemokine-receptor knockout mice. *J. Parasitol.* 88, 1014–1016.
- Cardillo, F., Voltarelli, J.C., Reed, S.G., Silva, J.S., 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immun.* 64, 128–134.
- Casemore, D.P., Armstrong, M., Sands, R.L., 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.* 38, 1337–1341.
- Datta, S.C., Opp, M.R., 2008. Lipopolysaccharide-induced increases in cytokines in discrete mouse brain regions are detectable using Luminex xMAP® technology. *J. Neurosci. Methods* 175, 119–124.
- Davami, M.H., Bancroft, G.J., McDonald, V., 1997. *Cryptosporidium* infection in major histocompatibility complex congenic strains of mice: variation in susceptibility and the role of T-cell cytokine responses. *Parasitol. Res.* 83, 257–263.
- Ehigiator, H.N., Romagnoli, P., Borgelt, K., Fernandez, M., McNair, N., Secor, W.E., Mead, J.R., 2005. Mucosal cytokine and antigen-specific responses to *Cryptosporidium parvum* in IL-12p40 KO mice. *Parasite Immunol.* 27, 17–28.
- Enriquez, F.J., Sterling, C.R., 1993. Role of CD4+ TH1- and TH2-cell-secreted cytokines in cryptosporidiosis. *Folia Parasitol. (Praha)* 40, 307–311.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30, 1305–1322.
- Glaberman, S., Moore, J.E., Lowery, C.J., Chalmers, R.M., Sulaiman, I., Elwin, K., Rooney, P.J., Millar, B.C., Dooley, J.S., Lal, A.A., Xiao, L., 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 631–633.
- Heinzel, F.P., 1994. Interleukin 12 and the regulation of CD4+ T-cell subset responses during murine Leishmaniasis. *Parasitol. Today* 10, 190–192.
- Huang, D.S., Lopez, M.C., Wang, J.Y., Martinez, F., Watson, R.R., 1996. Alterations of the mucosal immune system due to *Cryptosporidium parvum* infection in normal mice. *Cell. Immunol.* 173, 176–182.
- Jakobi, V., Petry, F., 2008. Humoral immune response in IL-12 and IFN-gamma deficient mice after infection with *Cryptosporidium parvum*. *Parasite Immunol.* 30, 151–161.
- Kapel, N., Benhamou, Y., Buraud, M., Magne, D., Opolon, O., Gobert, J.G., 1996. Kinetics of mucosal ileal gamma-interferon response during cryptosporidiosis in immunocompetent neonatal mice. *Parasitol. Res.* 82, 664–667.
- Kaushik, K., Khurana, S., Wanchu, A., Malla, N., 2009. Serum immunoglobulin G, M and A response to *Cryptosporidium parvum* in *Cryptosporidium*-HIV co-infected patients. *BMC Infect. Dis.* 9, 179.
- Khan, S.S., Smith, M.S., Reda, D., Suffredini, A.F., McCoy Jr., J.P., 2004. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B: Clin. Cytom.* 61, 35–39.

- Lean, I.S., McDonald, V., Pollok, R.C., 2002. The role of cytokines in the pathogenesis of *Cryptosporidium* infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15, 229–234.
- Mariotte, D., Comby, E., Brasseur, P., Ballet, J.J., 2004. Kinetics of spleen and Peyer's patch lymphocyte populations during gut parasite clearing in *Cryptosporidium parvum* infected suckling mice. *Parasite Immunol.* 26, 1–6.
- McDonald, V., 2000. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol.* 22, 597–604.
- McDonald, V., Bancroft, G.J., 1994. Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in scid mice. *Parasite Immunol.* 16, 315–320.
- Melinceanu, L., Sarafoleanu, C., Lerescu, L., Tucureanu, C., Caraş, I., Sălăgeanu, A., 2009. Impact of smoking on the immunological profile of patients with laryngeal carcinoma. *J. Med. Life* 2, 211–218.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., 2008. The adaptive immune response. In: Janeway's Immunobiology, seventh ed. Garland Science, New York, pp. 322–495.
- Nichols, G., 2008. Epidemiology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*, second ed. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL, pp. 79–118.
- Nix, B., Wild, D., 2005. Calibration curve-fitting. In: Wild, D. (Ed.), *The Immunoassay Handbook*, third ed. Oxford Elsevier Ltd., United Kingdom, pp. 233–244.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Jakubowski, W., DuPont, H.L., 1998. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 66, 441–443.
- Peeters, J.E., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vanderghenst, D., Naciri, M., Ares-Mazás, E., Yvoré, P., 1992. *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infect. Immun.* 60, 2309–2316.
- Petry, F., Jakobi, V., Tessema, T.S., 2010. Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp. Parasitol.* 126, 304–309.
- Pickering, J.W., Martins, T.B., Schroder, M.C., Hill, H.R., 2002. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and *Haemophilus influenzae* Type b. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 872–876.
- Singh, I., Theodos, C., Li, W., Tzipori, S., 2005. Kinetics of *Cryptosporidium parvum*-specific cytokine responses in healing and nonhealing murine models of *C. parvum* infection. *Parasitol. Res.* 97, 309–317.
- Snelling, W.J., Lin, Q., Moore, J.E., Millar, B.C., Tosini, F., Pozio, E., Dooley, J.S., Lowery, C.J., 2007. Proteomics analysis and protein expression during sporozoite excystation of *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Apicomplexa). *Mol. Cell. Proteomics* 6, 346–355.
- Tessema, T.S., Schwamb, B., Lochner, M., Forster, I., Jakobi, V., Petry, F., 2009. Dynamics of gut mucosal and systemic Th₁/Th₂ cytokine responses in interferon- γ and interleukin-12p40 knock out mice during primary and challenge *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunobiology* 214, 454–466.
- Ungar, B.L., Soave, R., Fayer, R., Nash, T.E., 1986. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J. Infect. Dis.* 153, 570–578.
- Ungar, B.L., Kao, T.C., Burris, J.A., Finkelman, F.D., 1991. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN- γ and CD4⁺ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 147, 1014–1022.
- Urban Jr., J.F., Fayer, R., Chen, S.J., Gause, W.C., Gately, M.K., Finkelman, F.D., 1996. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. *J. Immunol.* 156, 263–268.
- Villegas, E.N., Wille, U., Craig, L., Linsley, P.S., Rennick, D.M., Peach, R., Hunter, C.A., 2000. Blockade of costimulation prevents infection-induced immunopathology in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 68, 2837–2844.

Capítulo 5

Monoclonal antibody technology applied to the detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in human and cattle fecal samples

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

CODICES, V., NOVO, C. & MATOS, O. 2013. Monoclonal antibody technology applied to the detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in human and cattle fecal samples. *Adv Biosci Biotechnol*, 4, 7-16.

Monoclonal antibody technology applied to the detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in human and cattle fecal samples

Vera Codices¹, Olga Matos¹, Carlos Novo^{2,3*}

¹Unit of Medical Parasitology, Group of Opportunistic Protozoa/HIV and Other Protozoa, Centre for Malaria and Other Tropical Diseases, Institute of Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon, Lisbon, Portugal

²Chronic Diseases Research Centre, Oeiras Associated Laboratory, Faculty of Medical Sciences, New University of Lisbon, Lisbon, Portugal

³Unit of Medical Parasitology, Institute of Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon, Lisbon, Portugal
Email: cnovo@ihmt.unl.pt

Received January 10th, 2013; revised March 4th, 2013; accepted April 10th, 2013

Copyright © 2013 Vera Codices *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

With the discovery that the coccidian parasite *Cryptosporidium* sp. can cause severe symptoms in humans, many diagnostic techniques were quickly implemented such as microscopic visualization, immunofluorescence and PCR. Currently, there is no effective drug treatment and none of the current diagnostic methods is 100% accurate. In this study, a BALB/C mouse was subcutaneously immunized with *Cryptosporidium parvum* oocysts extract. The spleen was removed and the splenocytes were fused with SP2/0 myeloma cells in order to obtain hybridoma cells secreting antibodies specific to *C. parvum* antigens. Human and cattle fecal samples previously characterized by microscopy [Ziehl-Neelsen staining (ZN) and Lugol] and PCR for the presence of *C. parvum* and *Giardia duodenalis*, were analyzed by indirect immunofluorescence, using the developed hybridomas supernatants. The study shows that the selected hybridomas supernatants identify *C. parvum* oocysts in fecal samples in correlation with *C. parvum* oocysts identified using ZN/PCR. No false positive results were obtained and the two best supernatants gave 20% - 30% of false negative results. No cross reaction with *G. duodenalis* was observed. By comparing our results with those obtained with an immunofluorescence commercial kit, it suggests the potential use of the monoclonal antibodies present in two of the hybridomas supernatants as a detection tool of *C. parvum*. With a reliability of 80.8% and 73.1% versus ZN and PCR methods for IFI, compared with a reliability of 76.9% and 92.3%

versus ZN and PCR for commercial DIF kit, the supernatant 4.1D5 seems to be the most promising subject to further study its usefulness for *C. parvum* detection.

Keywords: Hybridomas; *Cryptosporidium parvum*; Immunofluorescence; Detection

1. INTRODUCTION

Cryptosporidium is an intestinal protozoan that was first recognized in mice in 1907 [1] and was first associated with diarrhea in humans in 1976 [2,3]. The disease, cryptosporidiosis, is a common gastro-intestinal illness in both animals and man worldwide, and is an important cause of morbidity and mortality in immunosuppressed individuals but self-limiting in immunocompetent hosts [4]. The infectious stages of the parasite (oocysts) are shed in the feces of infected individuals; they survive in adverse environmental conditions and are spread by direct contact or through contaminants (food and water). The high resistance of oocysts is attributed to a durable oocyst wall, a complex protective barrier consisting of a double layer of a protein-lipid-carbohydrate matrix. Due to the robustness of the oocysts, their tenacity, tiny size, and resistance to common disinfectants, it is difficult to eradicate the parasite from contaminated environments. To obtain sufficient control, both treatment of infected hosts and inactivation of oocysts are necessary [5-8].

Over the last two decades increasing numbers of cryptosporidiosis outbreaks have been recorded in developed countries, and the importance of the zoonotic species *C. parvum* is being recognized by both governmental agen-

*Corresponding author.

cies and the global scientific community [9-11]. Unlike other organisms belonging to the phylum Apicomplexa, such as *Plasmodium* spp. and *Toxoplasma gondii*, there is no clinically proven effective drug treatment against *Cryptosporidium* spp. [12,13].

Diagnosis is largely coprologic, although not all routine techniques have been proven to be effective. The conventional method of identification of oocysts is the examination of fecal smears stained with a modified Ziehl-Neelsen (ZN) method after oocyst concentration using a modified formol-ether sedimentation method [14]. Polymerase chain reaction (PCR) methods have been developed recently, but are used mainly in research [15-17].

Immunological detection methods have also been developed for clinical and environmental monitoring [18, 19].

Immunofluorescence techniques allow easy and quick identification of *C. parvum* oocysts in fecal smears after staining with monoclonal antibodies. Currently, there are several commercially available kits; however, their high price and the mandatory need of a fluorescence microscope for the smears analysis are disadvantages for the use of these techniques. There is still some controversy regarding the sensitivity of these techniques when compared with the differential staining. Some authors report that immunofluorescence is the most sensitive technique, but others describe similar sensitivities for both [6,20].

Flow cytometry (FC) combines the immunofluorescence principles with the binding specificity of monoclonal antibodies, presenting a higher sensitivity than the conventional immunofluorescence techniques. Due to this fact, many authors have described their use for the detection of oocysts in fecal and environmental samples [21-24]. In the context of immunologic response, FC has also been used to study the immunophenotype changes in peripheral blood and spleen cell populations due to *C. parvum* infection, in order to clarify some aspects of the cellular response to this infection [25]. Combining the principles of FC and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the Luminex xMAP® technology is also capable of performing a variety of immunoassays on the surface of fluorescence-coded beads. Recently, this high-throughput platform was used to determine the profiles of serum cytokines and immunoglobulins during an infection by *C. parvum* [26].

Thus, the aim of this study was to test monoclonal antibodies, produced by hybridoma technology using the spleen cells of mice immunized with oocyst extract of *C. parvum*, as a diagnostic tool in immunofluorescence assays for the detection of this parasite. With this purpose, human and cattle fecal samples infected with *C. parvum* as well as human fecal samples infected with *G. duodenalis* were analyzed by indirect immunofluorescence as-

say (IFI) using the obtained hybridomas supernatants. The results suggest the possibility of its use for detection of *C. parvum* oocysts in biological samples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Oocyst Extract Preparation

Purified oocysts of *C. parvum* (Morendun) obtained from cattle were purchased from Creative Science Company/Morendun Institute (Edinburgh, Scotland). According to the supplier, oocysts were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and stored at 4°C in the presence of antibiotics (penicillin and streptomycin). The viability of the oocysts preparation, checked by *in vitro* excystation, was 94.7%.

C. parvum crude soluble extract was prepared by sonication of oocysts with few modifications to the method described in [27]. Briefly, a total of 1×10^6 *C. parvum* oocysts were solubilized (30 min at 4°C) in lysis buffer [50 mM Tris (AppliChem), 5 mM EDTA (Merck), 5 mM iodoacetamide (Sigma), 0.1 mM Na-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (Sigma), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma), 1% (w/v) octyl beta-D-glucopyranoside (Sigma)] and stored at -80°C. Upon thawing, samples were sonicated (Sonoplus HD2070, Bandelin, Germany) with 20 pulses of 1-min (80%, 2 cycles; 60%, 4 cycles) on ice at 1-min intervals followed by an ultracentrifugation at 4°C (20,000 g for 30 min) to separate the soluble and insoluble fractions. The soluble fraction was used as crude soluble antigen of *Cryptosporidium* and protein concentration determined by Bradford's method using 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA) as standard. Absorbance readings were performed at 595 nm [28].

2.2. Immunization

One four-week-old female BALB/C ByJ mouse was obtained from Charles River Laboratories (France). The mouse was housed in a sterilized plastic cage with filter top, and fed with sterilized food and water (pH 3.5) *ad libitum* under SPF conditions. Seven subcutaneous immunizations of 10 µg of soluble antigen emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Sigma) (1:1 v/v) were administered with intervals of fifteen days. The experiments involving animals were performed in accordance with the national and international laws and institutional guidelines.

2.3. Serum Titer Determination

Fifteen days after the last immunization, a blood sample was collected by end tail cut. Serum obtained by centrifugation of the collected blood sample at 1500 rpm for 5 min at 4°C was stored at -20°C until use. Serum anti-

body titer was determined by indirect ELISA, adapted from [29,30]. Briefly, 96-well microtiter plates (Nunc-Immuno™ Plate Polysorp, USA) were coated overnight at 4°C with 0.1 mg/ml poly-L-lysine in 0.5 M carbonate buffer, pH 9.5, by adding 100 µl into each well. After washing once with PBS, 1 µg of antigen dissolved in carbonate buffer containing 0.5% glutaraldehyde, was added to each well and incubated for 2 hr at 37°C; followed by the addition of 100 mM glycine 0.1% BSA and incubation for 20 min at room temperature. Plates were blocked with 2% gelatin in PBS for 1 h at room temperature. After another wash with PBS-T (0.05% Tween 20-PBS), five serial serum dilutions (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 and 1:1600 in PBS) were added one to each well, and the plate incubated for 1 h at 37°C. After four washes with PBS-T, the Anti-Mouse Immunoglobulins (G, A, M) Alkaline Phosphatase conjugated serum (Sigma) (diluted 1:5000 in PBS/T-0.1% BSA) was added and incubated for an extra hour at 37°C. After washing the plates five times with PBS-T, 100 µl of the substrate solution containing 1 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) in 10 mM ethanolamine buffer, pH 9.6, was added. After 30 min of incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 405 nm in an ELISA microplate reader (NanoQuant Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, CH). The negative control of the reaction was performed using the serum collected from the same mouse, prior to inoculation with the antigen extract. A blank was run in parallel on the same plate and all the samples were run in duplicate.

2.4. Cell Culture and Hybridoma Generation

10⁸ splenocytes collected from the immunized mouse spleen were fused with 10⁷ SP2/0 myeloma cells previously grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) (Sigma), 0.2 mg/ml gentamicin (Sigma), using 40% PEG 1500 (Roche) as fusogenic agent, adapted from the protocol described in [31]. The resulting cell fusion products were distributed over 8 × 96-well flat-bottom plates and hybridoma cells selected in DMEM supplemented with 20% FCS, gentamicin (0.2 mg/ml), containing hypoxanthine (1 × 10⁻⁴ M)-aminopterin (4 × 10⁻⁵ M)-thymidine (1.6 × 10⁻⁵ M) (HAT medium) (Sigma) and incubated at 37°C, 5% CO₂, 95% humidity. Hybridoma culture supernatants were screened for the presence of antibodies towards *C. parvum* antigens by ELISA in the manner described previously for serum titer determination. Hybridomas supernatants whose ELISA absorbance value was at least, three times higher than the absorbance value of the blank were expanded in HAT medium at 37°C, 5% CO₂, 95% humidity. After growing, hybridomas cells were frozen in liquid nitrogen at -80°C

and the cell culture supernatants were used for indirect immunofluorescence assay.

2.5. Indirect Immunofluorescence Assay

The ELISA selected hybridomas supernatants were tested in duplicate by indirect immunofluorescence (IFI) assay for binding to *C. parvum* pure oocysts (Morendun), adapted from [32,33]. To the pre-treated slides with poly-L-lysine (Polysine® slides, Thermo Scientific) 25 µl of *C. parvum* pure oocysts were applied to the surface, air-dried at room temperature, and fixed with methanol. Slides were incubated with 30 µl per application of the selected hybridomas supernatants for 30 min at 37°C, in a 100% humidified chamber at 37°C, followed by one wash with PBS. After being air-dried at room temperature, slides were incubated with fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (Sigma) diluted at 1:400 (25 µl per application) for 30 min in the same humidity and temperature conditions. Subsequently, after a thorough wash with PBS and air-drying at room temperature, preparations were covered with two drops of mounting medium, and examined under an Olympus Fluorescence microscope equipped with an ultraviolet lamp, at 490 - 520 nm and 596 - 620 nm, with a magnification of 400×. As positive control of the assay, we used the commercial kit (Crypt-a-Glo™, A400-FLR-1X, Waterborne, Inc., New Orleans, Los Angeles) for direct immunofluorescence (DIF) of *C. parvum* pure oocysts, at the same magnification.

2.6. Fecal Samples Analysis by Immunofluorescence Using the Hybridomas Supernatants

The hybridomas supernatants that showed a better capability to detect *C. parvum* pure oocysts by the IFI protocol described above, were tested for the capability to detect *C. parvum* in human and cattle fecal samples, 10 samples known to be positive for *C. parvum* by both ZN and nested-PCR (ZN⁺/PCR⁺); eight samples known to be negative by ZN and positive by nested-PCR (ZN⁻/PCR⁺); and eight samples considered negative by both ZN and nested-PCR (ZN⁻/PCR⁻).

In addition, the same hybridomas supernatants listed above were also tested for possible cross-reactivity with *G. duodenalis*, using the same IFI protocol, applied to 10 human fecal samples, all negative for *C. parvum* by ZN and nested-PCR (ZN⁻/PCR⁻) and positive for *G. duodenalis* by microscopy (Lugol staining) and nested-PCR. *Cryptosporidium* oocysts in human and cattle fecal samples and *G. duodenalis* cysts in human fecal samples were detected on fecal smears after concentration using a modified formol-ether sedimentation method followed by a modified ZN staining [14] and Lugol staining, re-

spectively; and observed under an optical microscope with 400× magnification. After extraction of DNA by a Mini-BeadBeater/silica method [34], the presence of *C. parvum* DNA in fecal samples was confirmed by a nested-PCR of the 60-kDa glycoprotein (GP60) gene [16, 17]. A nested-PCR was used to amplify the β -giardin gene of *G. duodenalis* [35].

The control of the commercial kit Crypt-a-Glo, which contains both parasites (*C. parvum* and *G. duodenalis*), was used as positive control.

3. RESULTS

3.1. Hybridomas Screening

The ELISA screening of the cell supernatants obtained from wells with hybridomas cells showed that circa 200 wells presented hybridomas producing antibodies against *C. parvum* antigens, representing 26% of the total distributed cell fusion products wells. From those, only 16 hybridomas supernatants showed an absorbance value, at least, three times higher than the absorbance value of the blank (Absorbance = 0.132), ranging from 0.361 to 2.069.

3.2. Indirect Immunofluorescence Assay

To select which of the 16 ELISA positive hybridoma supernatants could detect the parasite by fluorescence emission, these supernatants were tested by IFI against *C. parvum* pure oocysts (Morendun) and the recognition pattern compared with that of DIF detection of *C. parvum* pure oocysts with the Crypt-a-Glo kit. From those, four hybridomas supernatants (4.1D5, 7.1D5, 3.1C5 and 6.2C6) gave a pattern consistent with this assumption (Figure 1). The remaining 12 hybridoma cell culture

supernatants present oocysts with a much weaker fluorescence than the observed for the oocysts from the kit positive control and, therefore, they were not selected for further assays.

In the next step, the four selected hybridomas supernatants (4.1D5, 7.1D5, 3.1C5 and 6.2C6) were checked in a known sample containing *C. parvum* oocysts and *G. duodenalis* cysts (kit positive control), for their binding capacity to both parasites (cross reaction), and differences in the extension of recognition (quantification) as well as their fluorescence pattern (different epitopes distribution). The results showed that the hybridomas supernatants 4.1D5 and 7.1D5 detected with great specificity a large amount of *C. parvum* oocysts. The hybridomas supernatants 3.1C5 and 6.2C6 also detected *C. parvum* oocysts, but in much less extension than the two first hybridomas supernatants. None of the four hybridomas supernatants detected *Giardia* cysts, only a few “ghosts” were observed due to the background fluorescence.

3.3. Fecal Samples Analysis by Immunofluorescence Using the Hybridomas Supernatants

The four selected hybridomas supernatants were tested in human and cattle fecal samples, by IFI, and the results are described in Table 1. In the 10 fecal samples ZN⁺/PCR⁺, the highest percentage of positive results was obtained with hybridomas supernatants 4.1D5 and 7.1C5, which gave positive results in 80% and 70% of the samples, respectively. Hybridomas supernatants 3.1C5 and 6.2C6 only detected *C. parvum* oocysts in 40% of fecal samples ZN⁺/PCR⁺. In the eight fecal samples ZN⁻/PCR⁺, all hybridomas supernatants detected *C. parvum* oocysts, which occurred in 25% to 37.5% of the tested

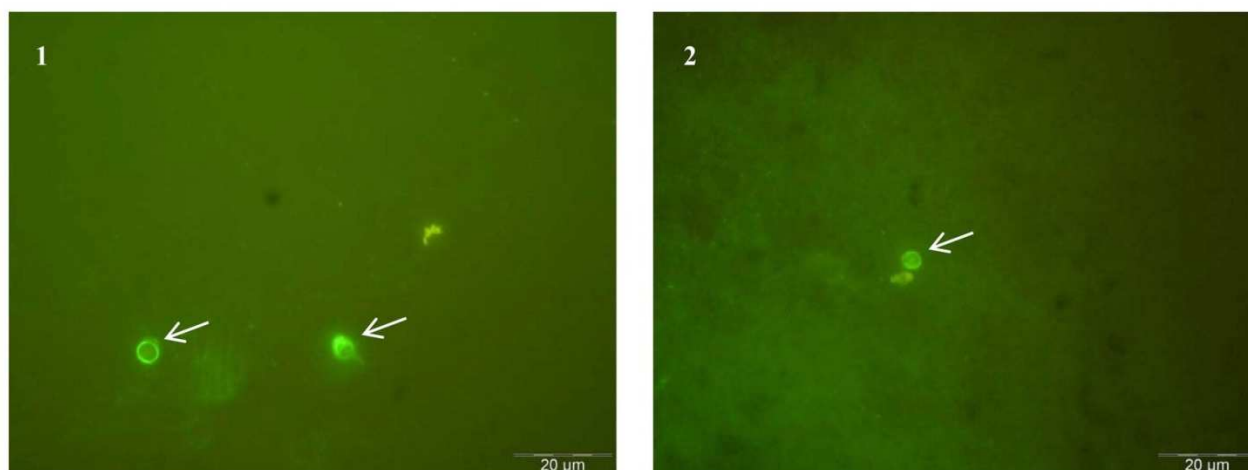


Figure 1. *C. parvum* oocysts detected by immunofluorescence assay (1000×). The image 1 represents the positive control and shows the *C. parvum* pure oocysts stained with FITC-labeled monoclonal antibody reagent from the kit Crypt-a-Glo™ (DIF). The image 2 shows the detection of *C. parvum* pure oocysts with one of the four selected hybridoma supernatants, by IFI. Oocysts are indicated with white arrows.

Table 1. Indirect immunofluorescence assay (IFI) for hybridomas supernatants specificity against human and cattle fecal samples. The first column represents the number of analyzed fecal samples, with the respective result for ZN staining and PCR. From the second to the fifth column are shown the results of testing the hybridomas supernatants (4.1D5, 7.1D5, 3.1C5 and 6.2C6) with each group of fecal samples.

Human and cattle fecal samples	Hybridomas supernatants							
	4.1D5		7.1D5		3.1C5		6.2C6	
	P	N	P	N	P	N	P	N
ZN⁺/PCR⁺ n = 10	8 (80%)	2 (20%)	7 (70%)	3 (30%)	4 (40%)	6 (60%)	4 (40%)	6 (60%)
ZN⁻/PCR⁺ n = 8	3 (37.5%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	2 (25%)	6 (75%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)
ZN⁻/PCR⁻ n = 8	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	8 (100%)

P = positive by IFI; N = negative by IFI.

samples. When the hybridomas supernatants were tested in the eight fecal samples that were negative by ZN and PCR, neither *C. parvum* oocysts nor *G. duodenalis* cysts were detected in any tested samples by any of the tested hybridomas supernatants.

When applied to the 10 human fecal samples positive for *G. duodenalis* using the same IFI protocol, none of the four selected hybridomas supernatants detected *Giardia* cysts in any of the samples.

In order to validate our immunofluorescence results, the previously used 26 human and cattle fecal samples were tested by DIF with the commercial kit Cryp-a-Glo and the results compared with those obtained with the two selected hybridomas supernatants (4.1D5 and 7.1D5), as they were the two supernatants presenting the best correlation with the ZN/PCR results (**Figure 2**). In the ZN⁺/PCR⁺ samples, the whole group was positive for *C. parvum* oocysts (100%), while with the two best supernatants we obtained positive results between 70% - 80%. For the group of samples ZN⁻/PCR⁺, the commercial kit detected *C. parvum* oocysts in 75% of samples, while the two selected supernatants gave positive results in 37.5% of the samples. In the group of samples ZN⁻/PCR⁻, all the samples analyzed were negative, in both the commercial kit and the two hybridomas supernatants, indicating a 100% agreement. A similar agreement (100% negativity) was observed for the results obtained for the human fecal samples, positive for *G. duodenalis* and negative for *C. parvum*.

Reliability is the extent to which an experiment or test procedure yields the same or compatible results on repeated assays. In this context, reliability was defined as the percentage of agreement between the analysis of fecal samples by IFI (with the hybridomas supernatants) and the reference method (ZN or PCR); and the percentage of agreement between the analysis of fecal samples by DIF (with the commercial kit) and the reference method (ZN or PCR). The reliability results obtained are

described in **Table 2**. From the total of 26 fecal samples analyzed, the highest reliability value between IFI and the reference method (ZN) was observed for the supernatant 4.1D5 (80.8%), better than for the commercial kit (76.9%). The analysis of the 26 fecal samples by DIF (with the commercial kit) and the reference methods (ZN and PCR) showed that the reliability with PCR (92.3%) was higher than reliability with ZN (76.9%). However, it is noted that although the reliability with our 4.1D5 supernatant (80.8%) is lower than PCR (92.3%), it is higher than ZN (76.9%).

4. DISCUSSION

There is an increasing demand for diagnostic testing for *C. parvum*, with a priority being placed on obtaining diagnostic results in an efficient and timely manner. Staining of fecal smears may help to identify *Cryptosporidium* oocysts and despite being an inexpensive technique, it still requires experienced personnel for the microscopic examination of stained smears capable of differentiating oocysts from similarly stained particles such as spores of fungi or yeast and oocysts, which is time consuming [14,36]. Direct and indirect immunofluorescence assays are more costly than the conventional microscopic techniques, but oocysts are readily identified, based on the three recommended criteria which are 1) characteristic apple-green fluorescence delineating the oocyst wall, under the FITC filter; 2) round or slightly ovoid objects; 3) and a size of 4 to 6 µm in diameter [37-39]. On the other hand, the PCR is still a more expensive technique than the immunofluorescence, more time consuming, and require specialized personnel and expensive equipment [6].

From the 16 hybridomas supernatants ELISA positive, four bonded to *C. parvum* pure oocysts and gave a fluorescence pattern which was consistent with that observed for DIF of the same samples using the commercial kit Cryp-a-Glo. The number of oocysts detected in each as-

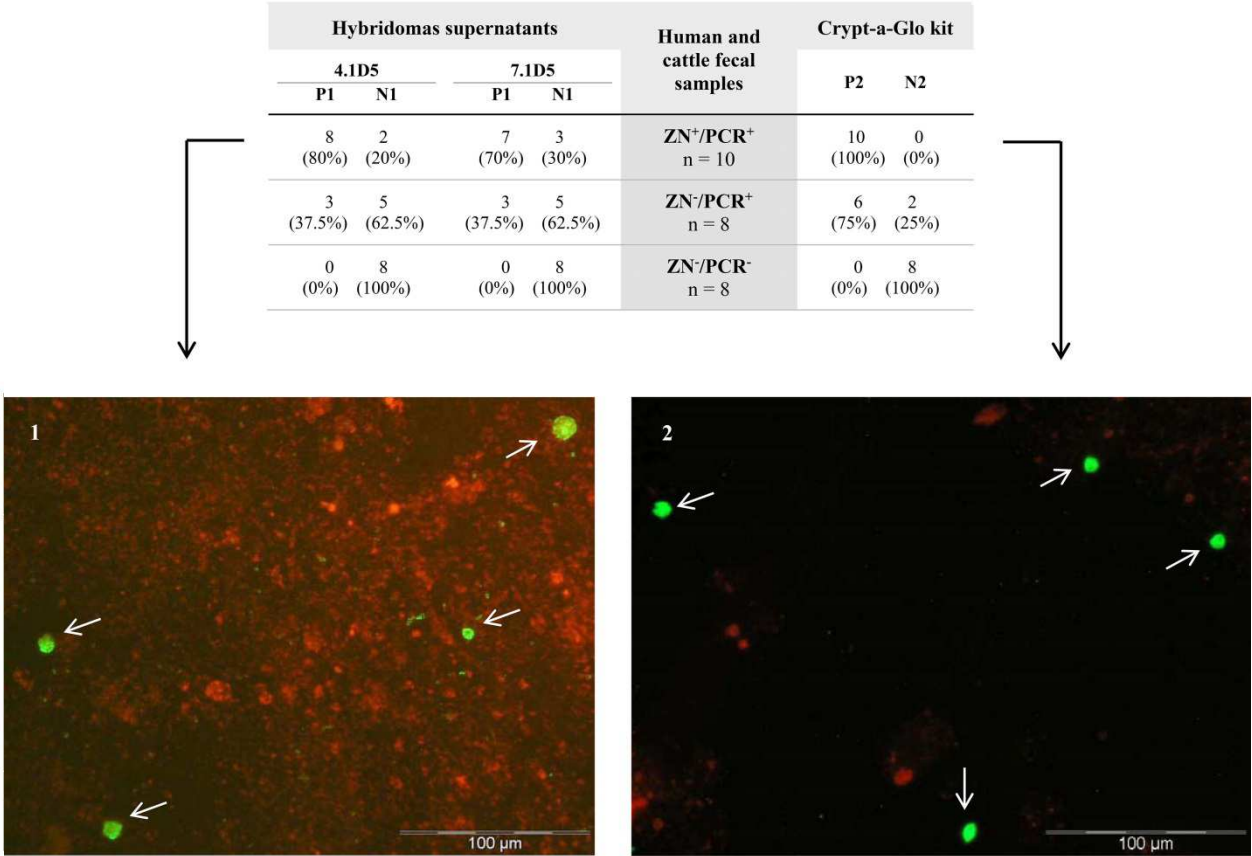


Figure 2. Direct and indirect immunofluorescence assay of human and cattle fecal samples with hybridomas supernatants and the commercial kit Crypt-a-Glo. In the table, the two first columns represent the results of testing, by IFI, the two best hybridomas supernatants (4.1D5 and 7.1D5) with each group of fecal samples. The third column represents the number of analyzed fecal samples with the respective result for ZN staining and PCR. The fourth column shows the result of testing the fecal samples by DIF with the kit. The images 1 and 2 show one of the samples tested by IFI with one of the referred hybridoma and tested by DIF with the commercial kit, respectively (400×). Oocysts are indicated with white arrows. P1 = positive by IFI; N1 = negative by IFI; P2 = positive by DIF; N2 = negative by DIF.

Table 2. Reliability percentages values between direct and indirect immunofluorescence assays with the reference methods, ZN and PCR. The data in the equations concerning the IFI and DIF results were transcribed from table 1 and table in **Figure 2**, respectively. The percentage of agreement between the analysis of the 26 fecal samples by IFI (with the hybridomas supernatants 4.1D5, 7.1D5, 3.1C5 and 6.2C6) and the reference method is presented from the second to the fifth column of the table. The sixth column represents the percentage of agreement between the analysis of the 26 fecal samples by DIF (with the commercial kit Crypt-a-Glo) and the reference method.

Reference method	IFI (hybridomas supernatants)				DIF
	4.1D5	7.1D5	3.1C5	6.2C6	(commercial kit)
ZN	80.8%	76.9%	69.2%	65.4%	76.9%
	[(8 + 5 + 8)/26]	[(7 + 5 + 8)/26]	[(4 + 6 + 8)/26]	[(4 + 5 + 8)/26]	[(10 + 2 + 8)/26]
PCR	73.1%	69.2%	53.8%	57.7%	92.3%
	[(8 + 3 + 8)/26]	[(7 + 3 + 8)/26]	[(4 + 2 + 8)/26]	[(4 + 3 + 8)/26]	[(10 + 6 + 8)/26]

say by two of the hybridomas supernatants (4.1D5 and 7.1D5) was identical to the oocysts identified in the sample by the kit. This led us to consider the hypothesis that these two hybridomas supernatants may be more specific for the detection of *C. parvum* than the others.

Cross-reactions can occur in immunofluorescence tests,

as the presence of a large number of fluorescent particles may cause difficulties during the microscopic confirmation of suspected oocysts [40,41]. In the present work, the specificity of the anti-*Cryptosporidium* hybridomas supernatants was tested regarding cross-reaction with *G. duodenalis* cysts using a known sample (kit positive con-

tro) as well as characterized human fecal samples by microscopy and PCR, positive for the presence of *Giardia* cysts and negative for the presence of *Cryptosporidium* oocysts. No *Giardia* cysts were detected in any of the tested samples, suggesting that there is no cross reaction with *G. duodenalis*. Despite the large morphological difference between oocysts and cysts, the intent of the specificity test was to precisely observe the presence of possible components in the cysts that might be recognized by the anti-*Cryptosporidium* hybridomas supernatants.

The results on fecal samples obtained by using the three methods (ZN, PCR and IF) for the diagnosis of *Cryptosporidium* infection did not give the same results. The two best hybridomas supernatants 4.1D5 and 7.1D5 detected *C. parvum* oocysts, by IFI, in 70% - 80% of the ZN⁺/PCR⁺ samples. Since the results of nested-PCR only shows the presence of *C. parvum* DNA, the positive result observed with ZN staining is exclusively due to the presence of *C. parvum* oocysts. The 20% - 30% false negatives obtained by immunofluorescence analysis using the hybridomas supernatants 4.1D5 and 7.1D5 may probably be explained by the differences in the targets of ZN staining and antibody binding. In those cases, where the oocysts presented a certain level of degradation but still maintaining the overall morphological structure, enough for ZN detection, this degradation may be sufficient to change the conformation and/or access of the protein present in the oocyst membrane, and targeted by the supernatant antibodies with the consequent negative result by IFI.

For ZN⁻/PCR⁻ samples, a 100% agreement was obtained between immunofluorescence analysis by those hybridomas supernatants and the comparative methods, ZN and PCR, which suggests that the samples were true negatives.

In the group of ZN⁻/PCR⁺ samples, these two hybridomas supernatants detected *C. parvum* oocysts in 37.5% of the samples. The PCR positive result indicated the presence of *C. parvum* DNA in all samples. Because of the ZN negative results, it suggests that there were no morphological intact oocysts or they were present in a very small amount or even they were non-homogeneously distributed in the stool samples. This discrepancy might be in accordance with the oocysts degradation, also suggesting an increased sensitivity of IFI over the ZN staining to detect oocysts. In fact, the ZN method has a low sensitivity when dealing with samples with low parasite burden, and excessive staining can result in false positive reactions from yeast cells, particularly when the oocysts are present in small numbers. The oocysts are acid-fast but their staining within a smear and between specimens are very variable, and oocysts vary from unstained to partial red and complete staining [14]. With

regard to the other two hybridomas supernatants (3.1C5 and 6.2C6), the results suggest that they have low affinity towards the recognized *C. parvum* protein(s).

The reliability of the two best supernatants 4.1D5 (80.8%) and 7.1D5 (76.9%) relative to ZN staining, combined with the 20% - 30% of false negative detection, suggest that these supernatants might contain promising antibodies to be included in an immunofluorescence diagnosis kit for *C. parvum* in biological samples from different sources. The higher reliability value between IFI vs ZN (80.8%) than IFI vs PCR (73.1%), and the higher variability between the commercial kit vs PCR (92.3%) than the commercial kit vs ZN (76.9%), suggest that the supernatant 4.1D5 is more reliable than the commercial kit relative to ZN staining. Although, this supernatant (4.1D5) is less reliable relative to the commercial kit when compared with PCR. From the reliability results it is possible to notice that, the supernatant 4.1D5 seems to be the most promising for further studies for its usefulness for *C. parvum* infection diagnosis, once it detects a higher number of positive ZN samples than the monoclonal antibody of the commercial kit.

There are few marketed kits for reliable detection of *C. parvum* oocysts by immunofluorescence assay. Other than the kit used in this work, another kit has been used as reference method in several comparative studies with stained methods and enzyme immunoassays, the MerifluorTM *Cryptosporidium* kit [42,43]. The ease of interpretation of results varied considerably for each assay. The acid-fast stained smears were more difficult to interpret, requiring frequent examination with oil magnification to identify the organisms. The Merifluor test was extremely easy to read as the brilliant apple-green-fluorescent organisms with typical morphology were visible at 400× and could be easily identified, thus requiring much less reading time and technician expertise. The test required a fluorescent microscope, which despite being expensive, is becoming a standard piece of equipment in many laboratories. These diagnostic kits do not take the place of routine stained smears but they have proven to be very useful when trying to confirm *Cryptosporidium* infections, and can be used for confirmation testing when the technician is unfamiliar with the organism. Thus, the results obtained with both kits, Merifluor and Crypt-a-Glo, corroborate with those obtained in this study.

When comparing the immunofluorescence assay with the ZN, we conclude that the first is a highly sensitive and specific technique which requires less reading time than the staining method when the oocysts are present in low numbers. Although the reagent cost is higher, requiring the availability of a fluorescence microscope (present in the majority of laboratories nowadays), the reduction in cost from the decreased need for technician expertise and reading time must also be considered. Mo-

lecular methods (PCR) are more widely used for genotyping and molecular epidemiological studies, and may have greater sensitivity than the immunofluorescence techniques, once the target is different (DNA for PCR and oocyst for IF). However, the processing of the samples requires the use for a large number of equipment, which translates into higher cost, more difficult to support by the laboratories, especially in developing countries (e.g. Africa and Latin America) and specialized personnel. Also, the import of immunofluorescence kits is costly for laboratories to monitor the parasites. Due to the aforementioned factors, it is important to conduct studies, such as the present work, for the purpose of developing reliable, specific, and less costly testing methods.

Here, we tested monoclonal antibodies produced by hybridoma technology using the spleen cells of mice immunized with oocyst extract of *C. parvum*, as a diagnostic tool in immunofluorescence assays for the detection of this parasite. We believe that this first initiative to produce antibodies in-house for immediate use is the starting point for immunodetection of *Cryptosporidium* and the results seem to indicate that it can be used for screening of samples from different origins. In this context, this might be a possible way to produce antibodies, in a less expensive way, to be used in developing countries.

However, the sensitivity of the immunofluorescence method by itself is still low, with the detection limit nearly to 10,000 oocysts per gram of watery stool and lower in the case of more formed stools [22,24]. FC may be considered as an alternative to the conventional immunofluorescence method, and few studies have already addressed the cytometric detection of *Cryptosporidium* in feces and water [22,24,44,45]. Even though cytometry currently requires expensive equipment, such equipment is present in many immunology laboratories (sometimes underutilized) and could often be shared by parasitologists. FC can be applied to small sample volumes and to the analysis of a very high number of samples in a reduced time, decreasing the cost of each analysis, reagents, and consumables. Combining the advantages of FC with the benefits of producing antibodies in-house, it would be expected to achieve optimal costs at several levels, making this combination an attractive option to be used in more laboratories.

The production of monoclonal antibodies produced by hybridoma(s) present in selected hybridoma(s) supernatants will be the next step to be developed by this research group. A full characterization of these antibodies will be done identifying their affinity, sensitivity, specificity correlation, reproducibility and the extended cross-reaction study to other microorganisms such as *Eimeria* sp, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella*

typhimurium, *Salmonella enteritidis*. The analysis of those parameters in a high number of samples containing different *C. parvum* isolates from different sources will be expected to characterize these antibodies in order to validate its use in conventional indirect immunofluorescence commercial kits, as well in analysis by flow cytometry. Further studies are needed to develop methods to reduce the percentage of false negative results in the detection of *C. parvum* by the hybridoma(s) supernatant(s), before it evolves as an effective screening tool for the detection of this microorganism.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to Moussa Elbayoumy, MD, for critical review and linguistic editing.

Vera Codices was supported by a Ph.D. grant (SFRH/BD/46558/2008) from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal).

REFERENCES

- [1] Tyzzer, E.E. (1907) A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, **5**, 12-13. <http://ebm.rsmjournals.com/content/5/1/12.extract>
- [2] Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C. and Rubin, C.E. (1976) Overwhelming watery diarrhea associated with a *cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, **70**, 1156-1160.
- [3] Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. and Yardley, J.H. (1976) Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, **70**, 592-598.
- [4] O'Donoghue, P.J. (1995) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, **25**, 139-195. [doi:10.1016/0020-7519\(94\)E0059-V](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)E0059-V)
- [5] Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., *et al.* (1994) A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, **331**, 161-167. [doi:10.1056/NEJM199407213310304](https://doi.org/10.1056/NEJM199407213310304)
- [6] Fayer, R., Morgan, U. and Upton, S.J. (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, **30**, 1305-1322. [doi:10.1016/S0020-7519\(00\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00135-1)
- [7] Sunnotel, O., Lowery, C.J., Moore, J.E., Dooley, J.S., Xiao, L., Millar, B.C., *et al.* (2006) *Cryptosporidium*. *Letters in Applied Microbiology*, **43**, 7-16. [doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01936.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01936.x)
- [8] Xiao, L. and Ryan, U.M. (2008) Molecular epidemiology. In: Fayer, R. and Xiao, L., Eds., *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, 119-171.
- [9] Craun, G.F., Calderon, R.L. and Craun, M.F. (2005) Out-

- breaks associated with recreational water in the United States. *International Journal of Environmental Health Research*, **15**, 243-262.
[doi:10.1080/09603120500155716](https://doi.org/10.1080/09603120500155716)
- [10] Yoder, J.S., Harral, C., Beach, M.J. and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010) Cryptosporidiosis surveillance—United States, 2006-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, **59**, 1-14.
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5906a1.htm>
- [11] Yoder, J.S., Wallace, R.M., Collier, S.A., Beach, M.J., Hlavsa, M.C. and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012) Cryptosporidiosis surveillance—United States, 2009-2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, **61**, 1-12.
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6105a1.htm>
- [12] Benson, C.A., Kaplan, J.E., Masur, H., Pau, A. and Holmes, K.K. (2004) Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: Recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports*, **53**, 1-112.
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5315a1.htm>
- [13] Fox, L.M. and Saravolatz, L.D. (2005) Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical Infectious Diseases*, **40**, 1173-1180. [doi:10.1086/428839](https://doi.org/10.1086/428839)
- [14] Casemore, D.P. (1991) Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, **44**, 445-451. [doi:10.1136/jcp.44.6.445](https://doi.org/10.1136/jcp.44.6.445)
- [15] Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G. and Thompson, R.C. (1998) Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: Clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 995-998.
<http://jcm.asm.org/content/36/4/995.long>
- [16] Glaberman, S., Moore, J.E., Lowery, C.J., Chalmers, R.M., Sulaiman, I., Elwin, K., *et al.* (2002) Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, **8**, 631-633.
[doi:10.3201/eid0806.010368](https://doi.org/10.3201/eid0806.010368)
- [17] Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O. and Antunes, F. (2003) Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 2744-2747. [doi:10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003)
- [18] Chan, R., Chen, J., York, M.K., Setijono, N., Kaplan, R.L., Graham, F., *et al.* (2000) Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 393-394. <http://jcm.asm.org/content/38/1/393.long>
- [19] Sharp, S.E., Suarez, C.A., Duran, Y. and Poppiti, R.J. (2001) Evaluation of the triage micro parasite panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 332-334.
[doi:10.1128/JCM.39.1.332-334.2001](https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.332-334.2001)
- [20] Alles, A.J., Waldron, M.A., Sierra, L.S. and Mattia, A.R. (1995) Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 1632-1634.
<http://jcm.asm.org/content/33/6/1632.long>
- [21] Arrowood, M.J., Hurd, M.R. and Mead, J.R. (1995) A new method for evaluating experimental cryptosporidial parasite loads using immunofluorescent flow cytometry. *The Journal of Parasitology*, **81**, 404-409.
<http://dx.doi.org/10.2307/3283822>
- [22] Valdez, L.M., Dang, H., Okhuysen, P.C. and Chappell, C.L. (1997) Flow cytometric detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 2013-2017.
<http://jcm.asm.org/content/35/8/2013.long>
- [23] Vesey, G., Deere, D., Weir, C.J., Ashbolt, N., Williams, K.L. and Veal, D.A. (1997) A simple method for evaluating *Cryptosporidium*-specific antibodies used in monitoring environmental water samples. *Letters in Applied Microbiology*, **25**, 316-320.
[doi:10.1046/j.1472-765X.1997.00237.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00237.x)
- [24] Barbosa, J.M., Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A.G., Hanscheid, T., Shapiro, H. and Pina-Vaz, C. (2008) A flow cytometric protocol for detection of *Cryptosporidium* spp. *Cytometry A*, **73**, 44-47.
[doi:10.1002/cyto.a.20502](https://doi.org/10.1002/cyto.a.20502)
- [25] Codices, V., Martins, C., Novo, C., Pinho, M., de Sousa, B., Lopes, A., *et al.* (2013) Cell phenotypic change due to *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent mice. *Acta Parasitologica*, **58**, 70-79.
[doi:10.2478/s11686-013-0113-2](https://doi.org/10.2478/s11686-013-0113-2)
- [26] Codices, V., Martins, C., Novo, C., de Sousa, B., Lopes, A., Borrego, M., *et al.* (2013) Dynamics of cytokines and immunoglobulins serum profiles in primary and secondary *Cryptosporidium parvum* infection: Usefulness of Luminex® xMAP technology. *Experimental Parasitology*, **133**, 106-113. [doi:10.1016/j.exppara.2012.11.003](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.003)
- [27] Snelling, W.J., Lin, Q., Moore, J.E., Millar, B.C., Tosini, F., Pozio, E., *et al.* (2007) Proteomics analysis and protein expression during sporozoite excystation of *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Apicomplexa). *Molecular & Cellular Proteomics*, **6**, 346-355.
[doi:10.1074/mcp.M600372-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M600372-MCP200)
- [28] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
[doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [29] Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *The Journal of General Virology*, **34**, 475-483.
[doi:10.1099/0022-1317-34-3-475](https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475)
- [30] King, T. (1989) A modified method for glutaraldehyde fixation of cells to a solid phase surface. *Journal of Tissue Culture Methods*, **12**, 107-109.
[doi:10.1007/BF01404495](https://doi.org/10.1007/BF01404495)
- [31] Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

- Nature*, **256**, 495-497. doi:10.1038/256495a0
- [32] Garcia, L.S., Brewer, T.C. and Bruckner, D.A. (1987) Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **25**, 119-121. <http://jcm.asm.org/content/25/1/119.long>
- [33] Arrowood, M.J. and Sterling, C.R. (1989) Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 1490-1495. <http://jcm.asm.org/content/27/7/1490.long>
- [34] Alves, M., Matos, O. and Antunes, F. (2001) Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **95**, 627-632.
- [35] Cacciò, S.M., De Giacomo, M. and Pozio, E. (2002) Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, **32**, 1023-1030. doi:10.1016/S0020-7519(02)00068-1
- [36] Clarke, S.C. and McIntyre, M. (2001) Acid-fast bodies in faecal smears stained by the modified Ziehl-Neelsen technique. *British Journal of Biomedical Science*, **58**, 7-10.
- [37] Rusnak, J., Hadfield, T.L., Rhodes, M.M. and Gaines, J.K. (1989) Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 1135-1136. <http://jcm.asm.org/content/27/5/1135.long>
- [38] Magi, B., Canocchi, V., Tordini, G., Cellesi, C. and Barberi, A. (2006) *Cryptosporidium* infection: Diagnostic techniques. *Parasitology Research*, **98**, 150-152. doi:10.1007/s00436-005-0050-6
- [39] Smith, H. (2008) Diagnostics. In: Fayer, R. and Xiao, L. Eds., *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, 173-207.
- [40] Rodgers, M.R., Flanigan, D.J. and Jakubowski, W. (1995) Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3759-3763. <http://aem.asm.org/content/61/10/3759.long>
- [41] Bull, S., Chalmers, R., Sturdee, A.P., Curry, A. and Ken- naugh, J. (1998) Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology*, **77**, 195-197. doi:10.1016/S0304-4017(97)00090-3
- [42] Kehl, K.S., Cicirello, H. and Havens, P.L. (1995) Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 416-418. <http://jcm.asm.org/content/33/2/416.long>
- [43] Garcia, L.S. and Shimizu, R.Y. (1997) Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 1526-1529. <http://jcm.asm.org/content/35/6/1526.long>
- [44] Cole, D.J., Snowden, K., Cohen, N.D. and Smith, R. (1999) Detection of *Cryptosporidium parvum* in horses: Thresholds of acid-fast stain, immunofluorescence assay, and flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 457-460. <http://jcm.asm.org/content/37/2/457.long>
- [45] Hsu, B.M., Wu, N.M., Jang, H.D., Shih, F.C., Wan, M.T. and Kung, C.M. (2005) Using the flow cytometry to quantify the *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Environmental Monitoring and Assessment*, **104**, 155-162. doi:10.1007/s10661-005-1608-6

Parte III

Conclusões

Capítulo 6

Conclusões gerais e perspectivas futuras

Cryptosporidium tem-se afirmado ao longo dos anos como uma importante causa mundial de patologia diarreica em humanos e animais. A diarreia é autolimitada em imunocompetentes, podendo no entanto, ser fatal nos imunocomprometidos, nos quais a diarreia prolongada pode estar associada à infecção persistente das células do epitélio intestinal. O facto de se tratar de um parasita ubiqüitário, com elevada resistência ao stress ambiental e à maioria dos desinfectantes e anti-sépticos habitualmente utilizados, tornam o seu estudo numa prioridade para a comunidade científica internacional.

Diversas técnicas de diagnóstico têm sido implementadas, mas nenhuma delas é cem por cento exacta. O elevado custo destas técnicas torna proibitivas determinadas abordagens, pelo que as medidas preventivas constituem, de longe, a estratégia mais eficaz para controlar a criptosporidiose.

Actualmente, não existem intervenções terapêuticas específicas disponíveis, particularmente nas situações de infecção nos imunocomprometidos, pelo que se torna impreterível a compreensão da resposta imune ao parasita. Um pouco por todo o mundo, os diversos estudos desenvolvidos têm-se focado essencialmente, em aumentar o conhecimento acerca dos mecanismos de resposta imunitária que protegem o hospedeiro vertebrado contra estes microrganismos oportunistas, permitindo desenvolver estratégias de imunoterapia para controlo da criptosporidiose. Neste contexto, este estudo tem como objectivo caracterizar e compreender a resposta imunitária humoral e celular de longo-termo, à infecção por *Cryptosporidium parvum* no modelo animal imunocompetente, em paralelo com a aplicação da tecnologia de anticorpos monoclonais ao diagnóstico desta infecção.

Com o objectivo de estudar a resposta imunológica de cada tipo celular envolvido, foram analisadas e caracterizadas, as populações e subpopulações do sangue periférico e do baço de murganhos oralmente inoculados com oocistos de *C. parvum*. A confirmação de infecção foi feita por técnicas parasitológicas, para detecção da presença de oocistos nas amostras fecais; por técnicas moleculares, para a detecção de DNA genómico do parasita; por técnicas histológicas, para a detecção de alterações

morfológicas ao nível do intestino e baço; e por técnicas imunológicas, para a detecção de oocistos nas amostras fecais e ao nível do intestino. A caracterização das populações de células e das linhagens celulares envolvidas foi efectuada por citometria de fluxo, não tendo sido detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os murganhos infectados e os controlos. Observou-se apenas uma resposta inflamatória subsequente à inoculação primária e reinfeção, com aumento do número de neutrófilos e eosinófilos circulantes, e a sua posterior diminuição para valores semelhantes aos apresentados pelos murganhos do grupo controlo. Tais variações são sugeridas como sendo o perfil exibido por estas populações de células no contexto de infecção por *C. parvum*, no organismo imunocompetente, particularmente os eosinófilos, cujo aumento tem sido identificado como uma característica da infecção noutros parasitas como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* sp. Ao nível do baço, o aumento observado nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, uma semana após a infecção e a reinfeção, seguida de diminuição, foi relacionado com o estabelecer da resposta adaptativa, da qual depende a protecção do organismo hospedeiro contra o parasita. Estudos recentes têm mostrado que uma das populações de linfócitos T CD4⁺ mais importantes, as células Treg, possui uma acção preventiva no que se refere aos danos provocados no hospedeiro por microrganismos estranhos e pela própria resposta imune contra estes. Apesar dos dados existentes não serem, ainda, suficientes para clarificar a importância e o envolvimento destas células no contexto da infecção por *Cryptosporidium*, observou-se, neste estudo, o seu aumento progressivo ao longo da infecção, com valores duas vezes superiores aos apresentados pelo grupo controlo, sugerindo-se que este aumento possa estar relacionado com a acção acima atribuída a estas células. Verificou-se, ainda, uma elevada variabilidade após a reinfeção, provavelmente relacionada com a idade dos murganhos associada à maturação do seu sistema imunitário. Para este objectivo do trabalho, os dados obtidos revestem-se de extrema importância, uma vez que constituem a primeira informação acerca do perfil da resposta mediada por células no contexto da infecção por *C. parvum* no hospedeiro imunocompetente, devendo ser considerados como ponto de partida para investigação futura.

Com o objectivo de perceber como é que um organismo imunocompetente responde à infecção e reinfeção por *C. parvum*, ao nível dos mediadores imunes, utilizou-se a tecnologia xMAP Luminex para o seu doseamento no soro e para a

determinação do perfil de resposta apresentado pelas citocinas e imunoglobulinas, em murganhos oralmente inoculados com oocistos do parasita. Após confirmação da infecção, efectuou-se o estudo dos mediadores imunes em plataforma Luminex, utilizando para o efeito, uma única amostra de pequeno volume de soro, por murganho. Observou-se uma resposta inicial que foi, maioritariamente Th₁, com particular aumento da secreção de TNF- α e IFN- γ , nos murganhos infectados quando em comparação com os grupos controlo. Assumiu-se esta variação como uma tentativa do sistema imunitário dos murganhos em debelar a infecção, tendo em conta que estudos anteriores mostraram que as citocinas secretadas pelas células Th₁ podem ser particularmente efectivas na protecção em situações de infecções intracelulares, como é o caso da infecção por *C. parvum*. Na fase de reinfeção, observou-se secreção de citocinas pelas células Th₂, como IL-4, IL-5 e IL-10, assim como diminuição na secreção de citocinas Th₁, principalmente as acima referidas. Este delicado balanço entre ambas as respostas, Th₁ para controlar o crescimento do parasita, e Th₂ para limitar a patologia, está de acordo com o descrito em estudos anteriores, referentes a outros parasitas intracelulares. Ao nível das imunoglobulinas, verificou-se que a IgG1 foi o isotipo que predominou ao longo de toda a infecção e reinfeção, tendo-se observado um pico de IgG2a após a reinfeção, seguido de diminuição. Sugere-se que esta variação possa estar relacionada com a função da IgG1 e da IgG2a, ao nível da opsonização dos agentes patogénicos e ao nível da sua neutralização, respectivamente. A detecção e percepção das variações, algumas delas bastante subtis, apresentadas por todos os mediadores imunes aqui estudados, foram conseguidas devido ao aproveitamento das vantagens inerentes à plataforma Luminex, principalmente relacionadas com a possibilidade de quantificar uma série de analitos a partir de reduzidos volumes de amostra. Este trabalho, pioneiro na sua abordagem, contribuiu assim, para incrementar o conhecimento no contexto da resposta imune à infecção por *C. parvum* no hospedeiro imunocompetente.

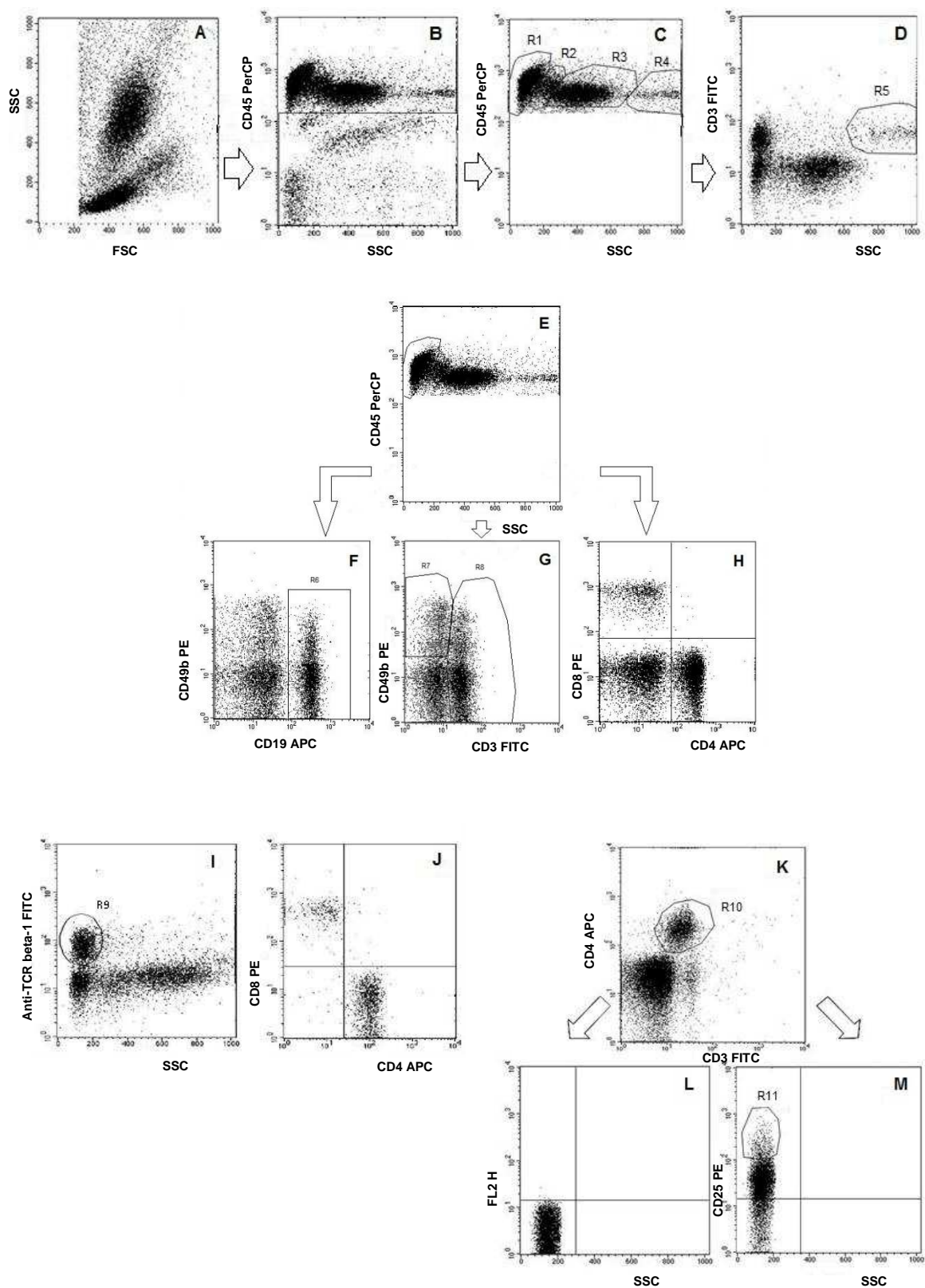
Apesar dos diversos estudos no âmbito do diagnóstico da criptosporidiose, o preço dos “kits” e dos materiais necessários à realização de determinadas técnicas, pode inviabilizar a utilização das mesmas. Neste sentido, urge a necessidade de desenvolver novas técnicas, mais rápidas de executar e menos onerosas, pelo que o terceiro grande objectivo deste trabalho residiu na produção de anticorpos monoclonais pela tecnologia de hibridomas, utilizando os esplenócitos de murganhos imunizados com extracto de

oocistos de *C. parvum*, como ferramenta de diagnóstico para a detecção deste parasita em amostras humanas e de animais. Seleccionaram-se os quatro sobrenadantes dos hibridomas que apresentavam melhor capacidade de detectar oocistos puros de *C. parvum*, que na fase seguinte foram testados em amostras fecais de humanos e animais, tendo sido também estudada a possibilidade de reacção cruzada com *Giardia duodenalis*. Apurou-se que dois destes sobrenadantes, 4.1D5 e 7.1D5, foram os mais específicos na detecção de oocistos de *C. parvum*, para além de terem apresentado melhor valor de confiabilidade, respectivamente 80,8% e 76,9%, relativamente à coloração de Ziehl-Neelsen. Além disso, a confiabilidade do “kit” comercial utilizado (76,9%) relativamente a Ziehl-Neelsen foi inferior à confiabilidade do sobrenadante 4.1D5 em relação à técnica de coloração. Tal, sugere que este sobrenadante seja o mais promissor em estudos futuros relativos à sua utilidade para o diagnóstico da infecção por *C. parvum*, uma vez que detectou maior número de amostras que são positivas por Ziehl-Neelsen do que o anticorpo monoclonal do “kit” comercial. Com este trabalho conseguiu-se estabelecer um ponto de partida para a produção de anticorpos *in-house*, de forma menos dispendiosa, destinados a serem imediatamente aplicados ao diagnóstico, particularmente no contexto dos países em desenvolvimento.

No futuro, pretende-se dar continuidade à investigação até aqui realizada, principalmente ao nível da caracterização dos anticorpos produzidos pelos hibridomas seleccionados, no que concerne à sua afinidade, especificidade, reprodutibilidade e avaliação de reacções cruzadas com outros microrganismos, como sejam *Eimeria* sp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, entre outros. Propõe-se assim, a determinação da sequência de aminoácidos dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos seleccionados, por “screening” em bibliotecas de fagos, e a identificação de proteínas indutoras de resposta imunitária a longo-termo, para estabelecer em definitivo quais são os anticorpos mais importantes no âmbito da infecção por *C. parvum*.

Anexos

Anexo 1- Na sequência da revisão efectuada pelos revisores da revista Acta Parasitologica, foram fornecidas as seguintes imagens, para justificar a metodologia utilizada.



Legend of the attached figures:

Flow cytometry analysis of data using different gating strategies to assess the populations classified within the study.

A to D- Leucocyte populations were analyzed after gating the CD45⁺ events, and were divided according to their scatter characteristics and CD45 expression, in Lymphocytes (R1), Monocytes (R2), Neutrophils (R3) and Eosinophils (R4). Eosinophils were confirmed according to their higher auto-fluorescence level (R5).

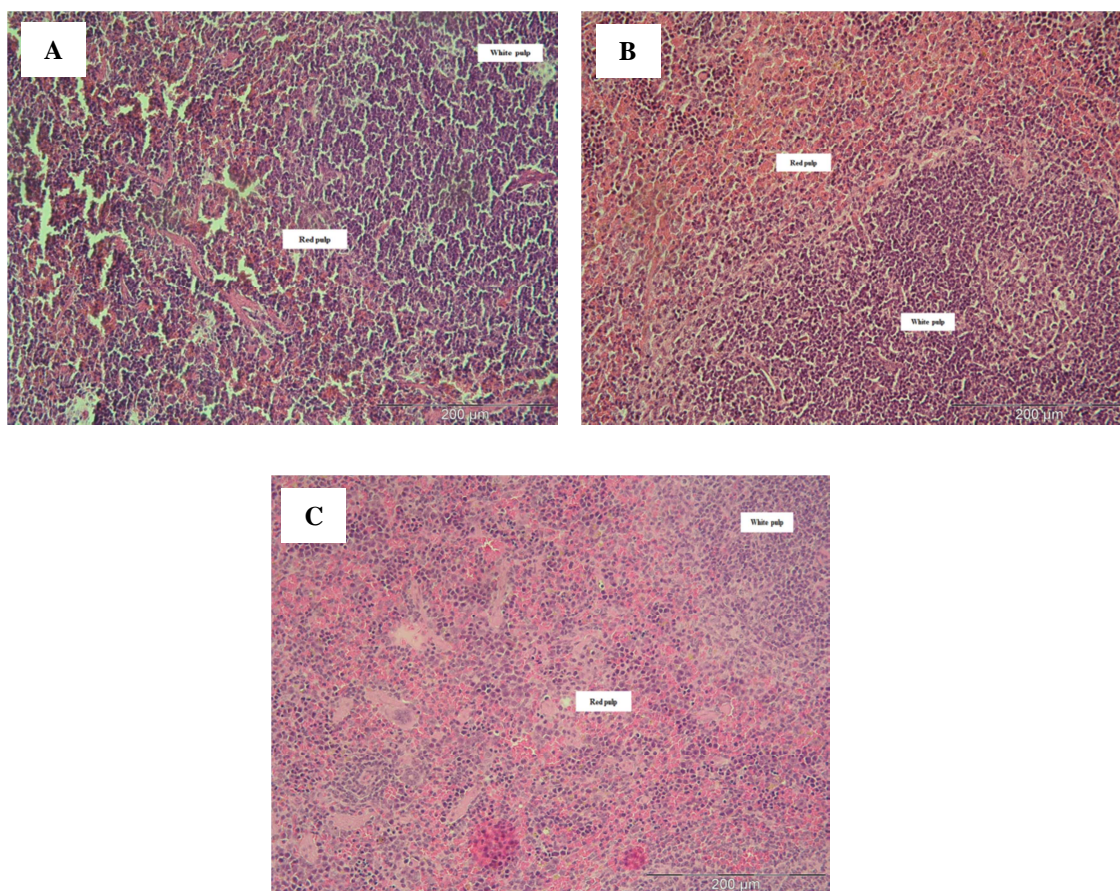
E to H- A CD45/SSC gate was used to isolate lymphocytes, and the expression of CD19 characterized B cells (R6), CD49b⁺CD3⁻ cells were classified as NK cells (R7), and finally, T cells were identified by the expression of CD3 (R8). The expression of CD4 and CD8 was also used to divide the major T cell subsets (CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells) within the lymphocyte gate.

I to J- TCRαβ⁺ T cells were also evaluated (R9), and divided in TCRαβ⁺ CD4⁺ T cells, TCRαβ⁺ CD8⁺ T cells, DN TCRαβ⁺ T cells and DP TCRαβ⁺ T cells, according to the expression of CD4 and CD8.

K to M- For the evaluation of CD25 expression within CD3⁺CD4⁺ T cells, these cells were gated (R10), and CD25 expression was assessed, using the level of fluorescence in the FMO control tube as the cut off point to consider a positive expression. CD25 expression was then classified as CD25⁺ or CD25⁺⁺ (R11) according to the level of fluorescence, as presented in dot plot M.

Anexo 2- Na sequência da revisão efectuada pelos revisores da revista Acta Parasitologica, foram fornecidas as seguintes imagens, para justificar os resultados obtidos.

To complement this finding we attach the figures A, B and C, concerning to spleens of control mice, spleens with splenomegaly in infected mice at day 25, and spleens with splenomegaly in infected mice at day 28, respectively, which may eventually be included in the article, if the reviewers think it is relevant.



Legend of the attached figures:

Histological examination of spleen sections. Light photomicrograph of spleen sections from non-infected control mice (A) and *C. parvum* infected mouse at day 25 PI (B) and day 28 PI (C). (Hematoxylin-eosin stain, x200).

